



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS**

IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN MOLECULAR POR LA TÉCNICA DE  
LA REACCIÓN DE LA CADENA POLIMERASA (PCR) MÚLTIPLE DE  
SUBGÉNEROS DE *LEISHMANIA* (*VIANNIA* Y *LEISHMANIA*) EN EL  
ECUADOR

**AUTOR**

David Alejandro Fonseca Carrera

**AÑO**

2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN MOLECULAR POR LA TÉCNICA DE  
LA REACCIÓN DE LA CADENA POLIMERASA (PCR) MÚLTIPLE DE  
SUBGÉNEROS DE *LEISHMANIA* (*VIANNIA* Y *LEISHMANIA*) EN EL  
ECUADOR

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología

Profesor guía

PhD. Segundo Manuel Calvopiña Hinojosa

Autor

David Alejandro Fonseca Carrera

Año

2019

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Identificación y diferenciación molecular por Reacción de la Cadena Polimerasa (PCR) múltiple de subgéneros de *Leishmania* (*Viannia* y *Leishmania*) en el Ecuador, a través de reuniones periódicas con el estudiante David Alejandro Fonseca, en el semestre 201910, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Segundo Manuel Calvopiña Hinojosa  
Doctor en Enfermedades Infecciosas  
C.I: 0501308415

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Identificación y diferenciación molecular por Reacción de la Cadena Polimerasa (PCR) múltiple de subgéneros de *Leishmania* (*Viannia* y *Leishmania*) en el Ecuador, del estudiante David Alejandro Fonseca, en el semestre 201910, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

María Gabriela Granja Bastidas

Máster en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Especialidad: Patología Molecular

C.I: 1712995149

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

---

David Alejandro Fonseca Carrera

C.I: 1722694369

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dirección General de Investigación de la UDLA que me permitió el uso de sus instalaciones para el desarrollo del presente proyecto.

A Irina Villacrés, por haber confiado en mí y me dio la guía y el apoyo necesario para preparar, iniciar y generar el presente proyecto investigativo.

Al Dr. Manuel Calvopiña, por haberme guiado, y compartido sus conocimientos que me permitieron entender y realizar la presente investigación.

Por último, a mis amigos: Alberto Toapanta, Belén Proaño y Samantha Cuasapas por su apoyo incondicional

## **DEDICATORIA**

A Dios, por haberme dado la capacidad y la fuerza de seguir adelante para la superación de diversas adversidades en la vida.

A mi madre y abuela Susana y Laura, que han estado a lado mío, apoyándome y direccionándome en toda mi vida.

A mis tíos Juan Carlos y María Augusta, por haberme influenciado en la toma de muchas decisiones importantes.

A mi madrina Gladys, por haber estado pendiente de mí en todos los años.

## RESUMEN

El protozoo del género *Leishmania* con varias especies ocasiona enfermedades denominadas leishmaniasis. El género *Leishmania* contiene dos subgéneros *Leishmania* y *Viannia*, que incluyen 21 especies patógenas para el hombre. En el Ecuador, se han identificado los 2 subgéneros con las especies *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. major* (subgénero *Leishmania*); *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. naiffi* y *L. lainsoni* (subgénero *Viannia*). Existe predominancia de especies de acuerdo a las regiones geográficas del país. Es conocido que diferentes subgéneros-especies determinan diferentes formas clínicas, así como diferencian el tratamiento y el pronóstico de la enfermedad. La técnica más usada para el diagnóstico de leishmaniasis es la identificación de las formas parasitarias amastigotes de *Leishmania* por microscopía de luz. Los métodos de caracterización e identificación de subgéneros y especies se basan en caracteres bioquímicos, inmunológicos y moleculares. Por microscopía es imposible diferenciar entre subgéneros debido a que estos organismos son morfológicamente idénticos. Las herramientas moleculares han demostrado utilidad para diagnosticar, caracterizar, tipificar, y cuantificar los agentes etiológicos. En la presente investigación, se ha realizado el diseño de una PCR múltiple con el propósito de diferenciar entre los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*, se generó un análisis bioinformático mediante alineamientos múltiples de secuencias de marcadores moleculares con el fin de obtener secuencias consenso para los dos subgéneros. A partir de dicho análisis se determinó que los marcadores moleculares para la diferenciación fueron los genes *cpb* y *nagA*, coincidiendo con los reportes de otras investigaciones. Por medio de la selección de los genes, se procedió al diseño de cebadores discriminantes y posteriormente a la estandarización de una PCR múltiple. Como resultado, se obtuvo amplificaciones con los siguientes tamaños; una de 300 pb perteneciente a la amplificación parcial del gen *nagA* para la identificación del subgénero *Leishmania* y otro de 172 pb perteneciente a la amplificación parcial del gen *cpb* para la identificación del subgénero *Viannia*. Los resultados por PCR fueron respaldados por un análisis de secuenciación evidenciando la alta confiabilidad

de la técnica. Ya estandarizada la técnica, se procedió a su aplicación en muestras humanas inmovilizadas en papel FTA provenientes de la Amazonía. La presente investigación permitirá la identificación precisa de los subgéneros en las lesiones de pacientes, así como la discriminación de vectores y reservorios. A futuro permitirá el desarrollo de otros proyectos enfocados a la distribución geográfica de dichos subgéneros

## ABSTRACT

The protozoa parasite of the genus *Leishmania* produce high impact diseases named leishmaniases. Mainly, this genus contains 2 subgenus (*Viannia* and *Leishmania*) that have 21 pathogenic species for humans. In Ecuador, it has been detected the 2-subgenus presence with the species: *L. mexicana*, *L. amazonensis* and *L. major* (*Leishmania* subgenus); *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. naiffi* and *L. lainsoni* (*Viannia* subgenus). There is a species predominance according to the geographical regions located in the country. It is known that many subgenus-species are closely related with the clinical manifestations in the affected patients as well as the disease's forecast and the respective downstream treatment. For this disease diagnosis, the most used technique is light microscopy that identifies the *Leishmania* amastigotes forms. The microscopic technique has a huge disadvantage that is the inability for the differentiation of the subgenus and species, due to, there is no a morphological difference between them. In the case of the detection between subgenus and species in *Leishmania*, there are some biochemical, immunological and molecular characteristics that are mainly considered. Some molecular tools have been demonstrated to be useful for the diagnosis, characterization, typing and quantification of the etiological agents. In the present investigation, we designed a multiplex-PCR with the main objective to differentiate between the *Leishmania* and *Viannia* subgenus. To achieve this objective, we made a bioinformatic analysis, that encompassed multiple sequences alignments from different molecular markers with the purpose of obtaining some consensus sequences for each subgenus. In base of this pre-analysis we determined that the *cpb* and *nagA* genes are optimum for the differentiation, coinciding with different studies asseverations. With the gene's selection, we designed some discriminant primers that allowed us to develop a downstream multiplex-PCR. As a result, we obtained some PCR products that have the following sizes; one 300 bp amplicon from the *nagA* gene for the *Leishmania* subgenus and a 172 pb amplicon from the *cpb* gene for the *Viannia* subgenus. The PCR results were confirmed by a later sequencing analysis that

demonstrated a high reliability in the developed technique. The standardized technique was applied in immobilized human samples in FTA papers from the Ecuadorian amazon. The present investigation will allow the precise subgenus identification in different patient lesions, as well as the discrimination of reservoirs and vectors. In the future, this technique could help in the development of some projects that are directed to the study of the subgenus geographical distribution.

# ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema .....	7
1.3. Objetivo general.....	9
1.4. Objetivos específicos.....	9
1.5. Justificación .....	9
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	11
2.1. El parásito: <i>Leishmania</i> .....	11
2.2. La enfermedad: leishmaniasis.....	23
2.2.1. Distribución de las leishmaniasis a nivel mundial .....	23
2.2.2. Distribución de las leishmaniasis en el Ecuador .....	25
2.3. El origen del género <i>Leishmania</i> .....	27
2.3.1. El origen del género <i>Leishmania</i> data desde eras geológicas antiguas.....	27
2.3.2. Taxonomía del género <i>Leishmania</i> .....	27
2.3.3. Distribución mundial de las especies patógenas de <i>Leishmania</i> ..	29
2.3.4. Distribución de especies patógenas de <i>Leishmania</i> en el Ecuador .....	30
2.4. Manifestaciones clínicas de las leishmaniasis.....	31
2.4.1. Leishmaniasis cutánea (LC) .....	32
2.4.2. Leishmaniasis kala-azar (LKA) .....	36
2.4.3. Leishmaniasis mucocutánea (LMC).....	38

2.5. Diagnóstico, caracterización e identificación de <i>Leishmania</i> .....	40
2.5.1. El diagnóstico dirigido a <i>Leishmania</i> .....	40
2.5.2. Detección y caracterización molecular de <i>Leishmania</i> .....	41
3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL ..	45
4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS .....	47
4.1. Análisis teórico y bioinformático de secuencias pertenecientes a especies de <i>Leishmania</i> para el diseño de cebadores que identifiquen los subgéneros <i>Leishmania</i> y <i>Viannia</i> por PCR .....	47
4.1.1. Selección virtual de marcadores moleculares.....	47
4.1.2. Diseño y análisis de cebadores .....	48
4.2. Optimización de un sistema diagnóstico por PCR simple y múltiple de <i>Leishmania</i> dirigido para los subgéneros <i>Viannia</i> y <i>Leishmania</i> .....	49
4.2.1. Población y Muestra .....	49
4.2.2. Preparación de las muestras para la extracción de ADN .....	51
4.2.3. Método de extracción estandarizado de ADN.....	51
4.2.4. Cuantificación de ADN.....	52
4.2.5. Estandarización de la PCR simple para detección de los subgéneros <i>Leishmania</i> y <i>Viannia</i> y secuenciación de controles positivos.....	53
4.2.5.1. Secuenciación de los controles positivos .....	55
4.2.6. Estandarización de PCR múltiple para identificación de subgéneros <i>Leishmania</i> y <i>Viannia</i> .....	55

4.2.7. Aplicación de PCR múltiple para la detección de los subgéneros <i>Leishmania</i> y <i>Viannia</i> en muestras de pacientes sospechosos portadores de <i>Leishmania</i> .....	58
<b>5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>60</b>
5.1. Análisis teórico y bioinformático de secuencias pertenecientes a especies de <i>Leishmania</i> para el diseño de cebadores que identifiquen los subgéneros <i>Leishmania</i> y <i>Viannia</i> por PCR .....	60
5.1.1. Selección de marcadores moleculares .....	60
5.1.2. Diseño y análisis de cebadores .....	66
5.1.2.1. Subgénero <i>Viannia</i> .....	66
5.1.2.2. Subgénero <i>Leishmania</i> .....	67
5.2. Optimización de un sistema diagnóstico por PCR simple y múltiple de <i>Leishmania</i> dirigido para los subgéneros <i>Viannia</i> y <i>Leishmania</i> .....	72
5.2.1. Cuantificación de ADN .....	72
5.2.2. Estandarización de la PCR simple para detección de los subgéneros <i>Leishmania</i> y <i>Viannia</i> y secuenciación de controles positivos .....	74
5.2.3. Secuenciación de los controles positivos .....	79
5.2.4. Estandarización de PCR múltiple para identificación de subgéneros <i>Leishmania</i> y <i>Viannia</i> .....	82
5.2.5. Aplicación de PCR múltiple para la detección de los subgéneros <i>Leishmania</i> y <i>Viannia</i> en muestras de pacientes .....	86
<b>6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>102</b>
6.1. Conclusiones .....	102

6.2. Recomendaciones.....	103
REFERENCIAS .....	104
ANEXOS .....	126

## 1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

Las leishmaniasis son un grupo de infecciones zoonóticas causadas por parásitos protozoarios del género *Leishmania* que afectan a la piel, mucosas y vísceras. Dichos parásitos poseen una alta incidencia a nivel mundial (Alvar et al., 2012).

Taxonómicamente el parásito intracelular obligatorio del género *Leishmania* está clasificado en el reino protista, del filo Euglenozoa en la familia Trypanosomatidae. Según varios autores, el género *Leishmania* se encuentra dividido en dos grupos: Euleishmania y Paraleishmania, que a su vez engloban varios subgéneros (Boité et al., 2012; Cupolillo et al., 2000).

El grupo Euleishmania contiene cuatro subgéneros (*Viannia*, *Leishmania*, *Sauroleishmania* y *Mundinia*), de los cuales dos (*Viannia* y *Leishmania*), presentan especies que tienen alta patogenicidad para el ser humano, es por ello que dicho grupo es el más estudiado y caracterizado (Akhoundi et al., 2016). El grupo Paraleishmania tiene hasta el momento dos subgéneros (*Endotrypanum* y *Porcisia*). Este grupo a diferencia de Euleishmania, no es muy estudiado debido a que las especies presentes en ese clado tiene alta divergencia genética (D=1.04) con secuencias muy inestables que muestran sesgos con las secuencias de las especies del grupo Euleishmania (Cupolillo et al., 2000; Espinosa et al., 2018).

Las especies pertenecientes al género *Leishmania* son transmitidas entre animales reservorios (dependiendo de la zona endémica) y al hombre por medio de la picadura de dípteros pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. Los dípteros del género *Phlebotomus* son los principales vectores en

zonas endémicas pertenecientes al viejo mundo (África, Medio Oriente, Europa y Asia), mientras que los dípteros del género *Lutzomyia* se encuentran únicamente en América (Stauch et al., 2014).

Los parásitos del género *Leishmania* pueden ocasionar un total de tres formas clínicas en los seres humanos: cutánea (LC), mucocutánea (LMC) y visceral (LV). En la forma de la leishmaniasis cutánea, se presentan varias úlceras generalizadas en todo el cuerpo, las cuales pueden evolucionar hasta convertirse en formas verrugosas, recidivans, nodulares, difusas, post-Kala azar, etc. (Alvar et al., 2012; Rojas et al., 2006). Así mismo, la leishmaniasis cutánea también puede progresar al cuadro mucocutáneo, en donde existe una aparición de afecciones al sistema nasal y traqueal, causando daño a las cuerdas bucales, cartílagos y estructuras óseas del paciente (Fleta et al., 2001). A diferencia de las formas cutánea y mucocutánea, la leishmaniasis visceral presenta cuadros graves como la inflamación extrema de órganos del aparato digestivo como el hígado y el bazo, produciendo hepatomegalia y esplenomegalia respectivamente (dos Santos et al., 2018).

Se sabe que las diferentes formas clínicas de leishmaniasis están estrechamente relacionadas con las especies infectantes. Así, la leishmaniasis visceral es causada por especies pertenecientes al subgénero *Leishmania* con las especies: *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. donovani* y *L. major*; y la leishmaniasis mucocutánea por especies del subgénero *Viannia* como *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis*. Para la forma cutánea, se conoce que es producida por todas las especies de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*, sin embargo, muchas especies pueden presentar evoluciones en los cuadros clínicos como se mencionó anteriormente (Akhoundi et al., 2017).

Actualmente, la forma clínica más prevalente a nivel mundial es la cutánea, donde el 95% de los casos se encuentran distribuidos en 3 regiones: la primera es en el medio oriente (Siria, Arabia Saudita e Irán), la segunda es en el norte de África (Túnez y Argelia) y la tercera es en América del Sur (Colombia, Perú,

Ecuador, Venezuela y Brasil). Para la leishmaniasis visceral, hasta el momento existe un total de 90.000 casos nuevos que aparecen dispersos en América (Brasil), África (Sudán, Somalia, Kenia, Etiopía) y Asia (India). En cambio, la leishmaniasis mucocutánea tiene un 90% de incidencia en países como Perú, Bolivia y Brasil (OMS, 2018).

Mundialmente, los parásitos del género *Leishmania* se encuentran distribuidos en 98 países de cuatro continentes (América, Europa, África, y Asia) que tienen distintas áreas endémicas aptas para el desarrollo del agente etiológico. América es el continente que tiene mayor número de especies de *Leishmania* patógenas para el hombre, distribuidas en toda su extensión a excepción de Canadá, Cuba y la parte sur de Argentina y Chile. Después de América; África y Asia son los continentes que tienen la predominancia de especies que pertenecen únicamente al subgénero *Leishmania* como: *L. donovani*, *L. infantum*, *L. tropica* y *L. major* y *L. arabica*. Europa solo tiene una especie patógena que es *L. donovani*.

El Ecuador, al estar ubicado en el noroeste de América del Sur, en la línea equinoccial y con variedad de climas tropicales, subtropicales y andinos, presenta ecosistemas óptimos para el desarrollo de vectores y reservorios, entonces aptos para la transmisión de las especies de *Leishmania* (Calvopiña et al., 2004). Según estudios previos, existe un total de ocho especies del parásito circulando en las tres regiones geográficas continentales, infectando a poblaciones principalmente rurales. En la Costa existe prevalencia de las especies *L. guyanensis*, *L. panamensis* y *L. braziliensis*, en la Región Andina predominan las especies *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana* y *L. major*. Por último en la Amazonía, están presentes especies como *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis* y *L. amazonensis* (Armijos et al., 1990; Calvopiña et al., 2006; Calvopiña et al., 2004; Kato et al., 2016; Kato et al., 2013).

En el Ecuador, el Ministerio de Salud Pública (MSP) considera a las leishmaniasis como un problema importante en la salud pública. En los últimos años, los casos relacionados a esta enfermedad se han incrementado gradualmente. En el año 2000, se publicó que la prevalencia de leishmaniasis se daba principalmente en las comunidades rurales (Calvopiña et al., 2004). Para el año 2016, los brigadistas del MSP identificaron un total de 236 casos de la enfermedad (MSP, 2016). Un año después, hubo un incremento del 82%; en total se detectaron 430 nuevos casos, de los cuales, la mayoría pertenecía al cuadro clínico de LC. En ese mismo año, analistas generaron registros de los patrones de aparición de dicha enfermedad y concluyeron que los meses de septiembre, octubre y diciembre aparecieron más de 300 casos distribuidos en las provincias costeras de Esmeraldas, Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas (“La leishmaniasis se aproxima a zonas urbanas de Manabí”, 2017).

En el país solo se presentan dos cuadros clínicos: leishmaniasis cutánea y mucocutánea. Esta afirmación es sustentada gracias a investigaciones previas que fueron llevadas a cabo por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP) en el año 2013, en donde este organismo estatal identificó la prevalencia de las principales especies que generan los cuadros clínicos nombrados anteriormente. El Ministerio de Salud Pública del Ecuador determinó que *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana*, y *L. amazonensis* tienen una mayor prevalencia en la región continental del Ecuador a comparación de *L. major*, *L. naiffi* y *L. lainsoni* (MSP, 2013).

La caracterización e identificación de los subgéneros y especies de *Leishmania* se dificulta cuando se utilizan como base las características morfológicas y morfométricas del parásito, por cuanto una de las características principales de estos organismos es la alta similitud morfológica entre especies del género *Leishmania*. En épocas anteriores al descubrimiento del ADN, la única técnica empleada para la identificación y caracterización del parásito amastigote de *Leishmania* fue la microscopía, pero sin llegar a la diferenciación entre especies.

Gracias a la microscopía, muchos investigadores pudieron observar y caracterizar al agente etiológico conjunto a su comportamiento parasitario con respecto a sus huéspedes y su relación con los vectores transmisores (Akhoundi et al., 2013). La desventaja principal de la microscopía consistía en la diferenciación entre especies debido a que estas, como ya se mencionó, no presentan diferencias significativas en su morfología celular. De hecho, el nombramiento por especies se dio gracias al apareamiento de los agentes etiológicos conforme a su distribución geográfica y sus descubridores (Donovan, 1903; Leishman, 1903; Ross, 1903; Soccol et al., 1993).

A la microscopia le siguieron varias técnicas innovadoras que utilizan las cualidades moleculares de los agentes etiológicos. Dichas técnicas pueden ser genómicas o proteómicas.

En proteómica, existen distintas técnicas como el Western Blot, el Dot Blot y ELISA (directo, indirecto y sánduche) que usan las propiedades de los anticuerpos para la detección de proteínas o péptidos auténticos de los agentes etiológicos. En el caso del inmunoensayo ELISA, diferentes investigaciones desarrollaron un método de detección de antígenos de *Leishmania* a partir de fluidos corporales externos como medida alterna a las muestras sanguíneas; en dichos trabajos se ha comprobado que no era necesaria la extracción invasiva de muestra sanguínea (suero) al paciente, solo bastó una muestra de orina para la identificación del mismo mediante el uso de anticuerpos monoclonales discriminantes. Adicionalmente, se ha determinado que el anticuerpo monoclonal BS5-IVD3 es el más apto para identificar a las especies *L. donovani* y *L. infantum* que ocasionan el cuadro clínico visceral, siendo capaz de unirse a un polipéptido del agente etiológico excretado en la orina de varios pacientes (Kohanteb et al., 1987; Sarkari et al., 1992). Otras investigaciones han empleado la técnica de Western Blot con la finalidad de caracterizar puntualmente los posibles antígenos de *Leishmania*, en muestras de distintos periodos de infección (kala-azar

temprana y kala-azar desarrollada) con el uso de anticuerpos monoclonales (Sinha, Arora, Datta, y Sehgal, 1992).

Sin embargo, existen otras técnicas proteómicas que no requieren el uso de anticuerpos monoclonales, entre esas técnicas se encuentra el análisis de proteínas funcionales, cuyo objetivo es la determinación de perfiles isoenzimáticos (zimodemas) que contienen distintos organismos. El grupo de Calvopiña (2006), mediante dicha técnica, a determinado un total de veintiún perfiles isoenzimáticos para distintas especies de *Leishmania* con el fin de concretar y detallar la distribución geográfica de las especies en el área continental del Ecuador.

A nivel genómico, existen distintos procedimientos que analizan la conformación de los ácidos nucleicos de los organismos. Dichos procedimientos, pueden ser usados tanto para la identificación, la discriminación y la cuantificación de los agentes etiológicos. Entre las herramientas genómicas más usadas se encuentran la: PCR (por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*), y la secuenciación (Akhoundi et al., 2017; van Dijk et al., 2018).

La PCR, es una técnica cuyo objetivo es la replicación *in vitro* de fragmentos de ADN. Desde su invención en los 80, la PCR ha sufrido varios cambios en base a los direccionamientos requeridos para el estudio de los organismos. Entre las variantes de la PCR más nombradas se encuentran: PCR múltiple, PCR anidada, PCR semianidada, PCR-RFLP, qPCR, PCR-LAMP, PCR-ELISA, etc. La PCR múltiple es aquella que amplifica simultáneamente varias zonas genómicas, en *Leishmania*, dicha técnica se ha empleado para la identificación o detección de agentes etiológicos a nivel de géneros, subgéneros y especies (Cella Conter et al., 2017; Jorquera et al., 2005). La PCR anidada y semianidada, es una técnica que consiste en la amplificación sucesiva de productos PCR o amplicones de manera parcial con cebadores discriminantes, dicha técnica ha sido dirigida principalmente para la discriminación de especies. (Akhavan et al., 2010). La

PCR-RFLP (por sus siglas en inglés *Restriction Fragment Polimorfism*) es aquella que emplea enzimas de restricción con el fin de determinar los polimorfismos nucleotídicos de las especies, es por ello que esta técnica es más usada para la determinación de análisis filogenéticos (Hajjarian et al., 2014). La qPCR (PCR cuantitativa), a diferencia de las anteriores, permite la medición exacta de amplicones generados en cada ciclo, en consecuencia, esta técnica permite cuantificar con exactitud la cantidad de agentes etiológicos en una muestra (Galluzzi et al., 2018). La PCR-LAMP, es aquella que amplifica regiones genómicas a temperatura constante, este procedimiento es muy usado para la determinación de la presencia del parásito en muestras clínicas debido a que no requiere de termocicladores y es una técnica económica (Khan et al., 2012). La secuenciación a diferencia de la PCR y sus variantes es usada para la detección puntual de especies y la generación de análisis filogenéticos. La secuenciación no solo es usada para análisis genómico, también puede ser usado para análisis epigenómico y transcriptómico de los agentes etiológicos (Cantacessi et al., 2015).

## **1.2. Planteamiento del problema**

A nivel mundial, no existe una técnica estandarizada y consensuada que permita la identificación exacta, puntual, inmediata y masiva de los parásitos del género *Leishmania*. Es por ello, que es un reto determinar una técnica *goldstandard* que faculte el establecimiento de un programa estratégico y efectivo para el control general de la enfermedad en todos los países (Rezvan et al., 2017).

Según la OMS, la detección del agente etiológico en seres humanos se realiza mayormente con pruebas parasitológicas rápidas en donde requieren evaluaciones microbiológicas, citológicas, e histológicas (OMS, 2018).

Entre las evaluaciones más usadas es la microscopía, en donde tiene una sensibilidad muy baja de entre 15 a 70% cuando el analista la aplica en cortos periodos de tiempo, lo que determina que esa técnica no es efectiva para la detección puntual del parásito de estudio cuando se trata de procesar grandes cantidades de muestras (Rezvan et al., 2017). Además, debido a que no existen diferencias a nivel morfológico entre las especies de *Leishmania*, la observación microscópica no tiene la capacidad de diferenciar entre subgéneros, especies y subespecies, ni detectar casos de coinfección o presencia de parásitos híbridos, por lo tanto, la identificación por microscopía también no puede pronosticar los posibles cuadros clínicos que pueden evolucionar en el paciente afectado (Kato et al., 2005; Khalid et al., 2012). Otra de las falencias que puede presentar la microscopía es el apareamiento de sesgos en los resultados obteniendo falsos positivos y falsos negativos, lo que implica el surgimiento de errores a nivel de diagnóstico (MSP, 2013).

Otra técnica muy usada para la detección es el cultivo celular, en donde su desarrollo implica equipamiento altamente sofisticado con un alto nivel asepsia requiriendo un alto grado de inversión económica y de tiempo. También, varios estudios han demostrado que, la viabilidad o supervivencia de los parásitos recolectados a partir de una biopsia con posterior inducción a cultivo *in vitro* es muy baja e ineficiente (Berman, 1997).

Como se había mencionado anteriormente, en el Ecuador, las leishmaniasis cutáneas y mucocutáneas son consideradas un problema de salud pública siendo endémicas en las regiones tropicales de la Costa y Amazonia. Hasta el presente se han identificado los 2 subgéneros patogénicos del género *Leishmania*, entre los 2 subgéneros suman 8 especies circulando en el territorio continental e insular (Armijos et al., 1990; Calvopiña et al., 2006; Calvopiña et al., 2004; Kato et al., 2016; Kato et al., 2013).

En el Ecuador, la técnica *goldstandard* más usada para la identificación y diagnóstico de *Leishmania* es la microscopía de luz, a pesar de las innumerables desventajas que esta presenta. El MSP, evita el uso de técnicas moleculares debido a los altos costos que estas tienen, principalmente en el apareamiento de brotes.

### **1.3. Objetivo general**

Desarrollar y estandarizar la técnica de la PCR-múltiple para identificar y diferenciar molecularmente entre los subgéneros de *Leishmania* (*Leishmania* y *Viannia*).

### **1.4. Objetivos específicos**

- Realizar un análisis bioinformático de marcadores moleculares y diseñar cebadores específicos para los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*, utilizando la base de datos GenBank.
- Implementar la técnica de multiplex-PCR para el diagnóstico molecular de los subgéneros de *Leishmania* spp. en muestras provenientes de la Amazonía.

### **1.5. Justificación**

Dada la problemática generada por las técnicas citológicas e histológicas, las técnicas moleculares como la PCR y la secuenciación presentan ventajas muy significativas para la detección, identificación y diferenciación de los agentes etiológicos presentes en cualquier tipo de muestra (El-Salam, Ayas, y Ullah, 2014). Para la PCR, distintos estudios han demostrado que esta técnica posee

un alto nivel de efectividad en comparación con la microscopía clásica. Según Harris (1998), la cantidad mínima de ADN que puede ser amplificada en una PCR es de hasta 1 femtogramo, demostrando un alto nivel de sensibilidad y efectividad para el análisis de diversas muestras. Otra ventaja que puede mostrar la PCR, es el tiempo de procesamiento y detección, ya que esta emplea un menor tiempo de desarrollo en comparación de la microscopía y el cultivo celular, tomando en cuenta que el apareamiento de sesgos y errores es definitivamente nulo. En consecuencia, una técnica estandarizada como la PCR puede examinar un gran número de muestras en el caso de un brote de alto impacto (Antinori et al., 2007).

Por otro lado, un punto importante a considerar para la PCR, es el alto nivel de especificidad. La PCR, es una técnica que puede ser diseñada para la diferenciación entre subgéneros de los agentes etiológicos. El uso de cebadores específicos cuya capacidad es la discriminación entre subgéneros, permitirá a los investigadores relacionar a las especies pertenecientes de un subgénero con respecto a los cuadros clínicos que se pueden desarrollar o manifestar a futuro (Akhoundi et al., 2017). Por lo anteriormente expuesto, la búsqueda de una nueva variante de la técnica PCR que permita la discriminación entre subgéneros es importante. Esto no solo permitirá el diagnóstico rápido y confiable de positividad o negatividad de la muestra, sino que además permitirá conocer el subgénero y por ende la aproximación a la especie presente en la lesión del paciente, determinándose además la distribución geográfica de los subgéneros en las distintas regiones del país (Kato et al., 2016). Con la obtención de este resultado el tratamiento será de acuerdo al subgénero y se inferirá la curación, pronóstico y/o complicaciones. Otro punto a favor de la especificidad del uso de cebadores, es la evasión por parte de la técnica a no amplificar material genómico innecesario como ADN humano. Como consecuencia, la PCR puede ser aplicada en cualquier tipo de muestras de distinto origen, ya sea humano o de animales (vectores y reservorios).

Dado el reto de encontrar una técnica *goldstandard* para la identificación y diagnóstico de los agentes etiológicos (*Leishmania*), el presente proyecto no solo propone ventajas técnicas a comparación de los métodos usados habitualmente a nivel mundial y nacional, si no también pretende optimizar la técnica con la finalidad de disminuir al máximo los costos que esta requiere. En consecuencia, dicha técnica va a tener mayor rango de amplitud para su aplicación en el procesamiento masivo de muestras conjunto a una viabilidad para ser usada en diversas localidades a nivel nacional, e inclusive en otros países.

## **2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

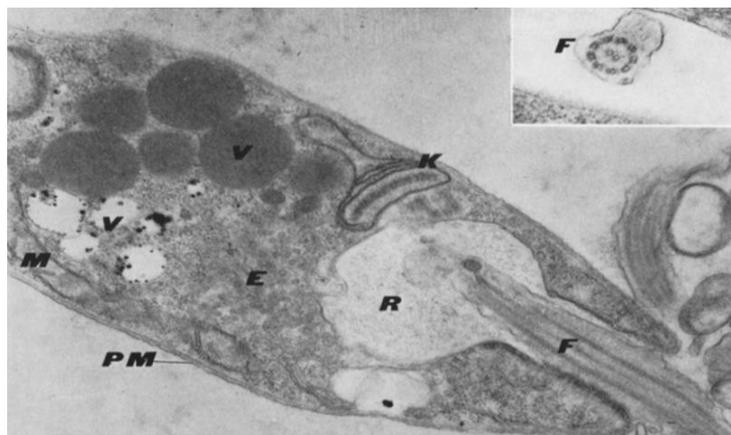
### **2.1. El parásito: *Leishmania***

Las especies de *Leishmania* son parásitos unicelulares pertenecientes al género *Leishmania* de la familia trypanosomatidae del reino protista (Steverding, 2017). Cabe mencionar que dichos parásitos también tienen la capacidad de infectar no solo a seres humanos, sino también a distintos animales que viven en las zonas endémicas. Estos animales pueden ser tanto domésticos o silvestres, es por eso que las leishmaniasis también son consideradas como una enfermedad zoonótica de alto impacto en la salud de la fauna urbana y silvestre (Ashford, 2000; Dantas-Torres, 2007).

#### **2.1.1. Características celulares y morfológicas de *Leishmania***

Los protozoos del género *Leishmania* son considerados como organismos digenéticos, es decir que cambian su morfología dependiendo de la etapa de su ciclo de vida (Sunter et al, 2017). Los cambios morfológicos que este tipo de parásito sufre dependerán de dos elementos: el hospedero que puede ser cualquier tipo de mamífero y el vector que pueden ser insectos voladores. Se sabe que los cambios en la morfología de *Leishmania* son muy versátiles debido

a la gran diversidad de formas celulares que se encuentran en los organismos hospederos y vectores. *Leishmania* tiene dos formas celulares principales: la primera forma es el amastigote que es predominante en células mamíferas y la segunda es el promastigote que es predominante en el vector. La morfología celular de *Leishmania* tiene varias características de interés. De manera inicial esta tiene una simple membrana citoplasmática lisa que rodea a todo el complejo celular, debajo de la membrana se encuentra un área estriada separada por una capa de baja densidad. La zona estriada contiene una alta cantidad de estructuras tubulares de un diámetro entre 150 a 200 Armstrong (A°), dichas estructuras son conocidas como fibrillas subpelículas y estas se encuentran paralelamente en el axis de la célula (Aleman, 1969).



*Figura 1.* Componentes intracelulares de *Leishmania*.

Tomado de (Aleman, 1969)

V (Vacuola intracelular), R (Reservorio flagelar), E (Retículo endoplasmático), M (Mitocondria), F (Flagelo longitudinal y transversal), K (Kinetoplasto), PM (Membrana Plasmática)

Dentro del citosol, la célula de *Leishmania* tiene varios componentes de interés que se pueden observar claramente en la Figura 1:

- a. Kinetoplasto; este contiene una doble membrana que está invaginada dando lugar a una forma de media luna, dentro de dicha forma se pueden observar crestas bien definidas que dividen al sistema formando una

- estructura fibrosa (Aleman, 1969). Cabe mencionar que el kinestoplasto está compuesto principalmente de ADN y este puede ser identificado experimentalmente con tinción de Feulgen (Steinert et al., 1967).
- b. Blefaroplasto; también llamado como cuerpo basal, es una estructura que se ubica a lado del kinetoplasto y es en donde se posiciona el axonema. El axonema es un componente rico en microtúbulos y es aquel que forma parte en el desarrollo morfológico del flagelo de la célula, los microtúbulos envuelven al sitio de unión flagelar (Aleman, 1969).
  - c. Aparato de Golgi; es una estructura conformada de varios sacos cuya función principal es la biosíntesis de varios tipos de lípidos como los fosfolípidos (Berg, Stryer, Tymoczko, y Macarulla, 2007). En *Leishmania* el aparato de Golgi generalmente se ubica alrededor del kinetoplasto y núcleo (Ogbadoyi, Robinson, y Gull, 2003).
  - d. Mitocondrias; las mitocondrias tienen como función la respiración celular mediante la fosforilación oxidativa y el consumo de ácidos grasos (Berg et al., 2007). En *Leishmania* las mitocondrias pueden tener tamaño variable y tienen alta concentración de Figuras de mielina (Aleman, 1969; Ogbadoyi et al., 2003).
  - e. Vacuolas; son cuerpos intracelulares cuya función es el almacenamiento de varios componentes para el metabolismo celular, en la mayoría de casos el protozoo almacena lípidos y otros componentes metabólicos para su desarrollo dependiendo de su ciclo de vida (Sunter y Gull, 2017).
  - f. Reservorio; también llamado bolsillo flagelar, es una invaginación que permite generar el espacio para el depósito del flagelo, dicho reservorio se encuentra mayormente pronunciado en la fase celular de amastigoto (Lacomble et al., 2009). A nivel molecular, el reservorio contiene un total de 34 proteínas de unión flagelar que participan activamente en las dos fases morfológicas de *Leishmania*. Cabe mencionar que el reservorio tiene dos dominios principales; el bolsillo y el cuello, dichos dominios son unidos por una estructura larga denominada collar. Otra de las características más predominantes del reservorio es la existencia de un cuarteto microtubular (MtQ) que se desplaza por los dos dominios ya

indicados anteriormente conjunto a un filamento de unión con el flagelo (FAZ) (Wheeler, Sunter, y Gull, 2016).

- g. Flagelo; es una estructura rica en microtúbulos y microfibrillas, este se encuentra situado después del cuerpo basal de la estructura principal, este elemento es el único organelo en donde puede sufrir endocitosis y exocitosis dependiendo del estado del ciclo de vida del parásito (Lacomble et al., 2009). Si el protozoo se encuentra en fase de amastigoto, el flagelo tiene una disminución morfológica considerable y está ubicado en el citosol dentro del reservorio, en el caso de que el protozoo se encuentra en fase de promastigoto, el flagelo sufre un aumento de tamaño saliendo fuera del citosol (Sunter et al., 2017). Se sabe que el flagelo de *Leishmania* ejecuta tres funciones esenciales para la supervivencia del parásito protozoario en el vector y en el hospedero. La primera función es la motilidad ya que el flagelo permite al promastigoto desplazarse dentro del vector y del hospedero dependiendo del tipo de tejido que se encuentre (Coutinho-Abreu et al., 2010). La segunda función es la participación mediadora de aneji3n con otros sistemas celulares, en donde la estructura flagelar sirve para mantener al parásito enganchado o unido al intestino del vector con la finalidad principal de evitar la expulsión del mismo mediante defecación (Ye et al., 2012). La tercera función del flagelo es sensorial, en donde existen varias hipótesis que explican que dicha estructura tiene la capacidad de identificar mediante proteínas receptoras extracelulares distintos metabolitos que sirven como elementos comunicadores de las características del medio en donde se encuentran (Barros et al., 2006).

### **2.1.1.1. Fisiología de *Leishmania***

#### **2.1.1.1.1. Ciclo de vida de *Leishmania***

La transmisión de *Leishmania* depende principalmente de dos elementos importantes; el vector y el hospedero (Alemayehu et al., 2017) (Figura 2).

Para los vectores de *Leishmania*, se ha determinado que los insectos dípteros pertenecientes al género *Lutzomyia* y *Phlebotomus* son los más adecuados para la propagación de los protozoos debido a que estos se alimentan de la sangre de distintos mamíferos que se encuentran en varios ecosistemas tropicales y subtropicales (Maroli et al., 2012). Al vivir en climas tropicales y subtropicales, el factor abiótico de la temperatura es muy determinante en el desarrollo de los dípteros ya que estos son muy susceptibles a la deshidratación, es por eso que estos se refugian en distintos microhábitats como hoyos, cuevas, rocas y casas (Claborn, 2010; Goddard et al., 2007). Por ello, muchos mamíferos (silvestres y domésticos) tienen una mayor susceptibilidad de adquirir dichos parásitos y participar en el ciclo de vida como reservorios para futuros contagios (Souza et al., 2009; Travi et al., 2018).

En el caso de los organismos huéspedes existe un amplia variedad de posibles candidatos, tomando en cuenta que existen dos tipos de interacciones; humana (antroponosis) y zoonótica (Alemayehu et al., 2017). Adicionalmente, se conoce que existen muchos tipos de organismos reservorios de acuerdo a la ubicación geográfica en donde se encuentran. Para los continentes africano, asiático y europeo (Viejo Mundo); los posibles hospederos silvestres pueden ser los roedores, los murciélagos y los zorros. Para el continente americano (Nuevo Mundo); los posibles huéspedes salvajes pueden ser los monos, varias especies de osos, armadillos, roedores, ardillas y varios marsupiales (Daszak et al., 2001; Roque et al., 2014).

Entendiendo los dos elementos importantes para el desarrollo de *Leishmania*, el ciclo de vida comienza desde la picadura del vector hacia el hospedero, en donde indirectamente el díptero inyecta al protozoo en forma de promastigote, el promastigote comienza a desplazarse con ayuda de su flagelo hacia el tejido linfático del hospedero con el fin de entrar a un proceso de fagocitosis ejecutado

por células del sistema inmunológico. Ya finalizado el proceso, el promastigote absorbido dentro de la célula cambia su morfología celular a amastigote en donde entra a un proceso de reproducción celular. El macrófago infectado con amastigotes sufre lisis celular liberando a los parásitos unicelulares en el medio, ocasionando una reacción en cadena que genera un estrés a las células aledañas. Los macrófagos no infectados tratan de reducir en número a los amastigotes liberados mediante fagocitosis repitiendo la fase de reproducción. El organismo afectado comienza a presentar sintomatologías que afectan a su comportamiento. Cabe mencionar que existen casos en donde el organismo hospedero es asintomático, es decir que este puede contener a los parásitos, pero no presenta ningún cuadro clínico prominente. El ciclo se cierra cuando otro díptero obtiene la sangre con el fluido linfático infectado y succiona a los amastigotes transfiriéndolos a su sistema digestivo. Los amastigotes se ubican en el intestino del insecto con la finalidad de cambiar su estado morfológico a promastigote obteniendo así un flagelo que le permita el movimiento. Completado el cambio morfológico, los nuevos parásitos se transfieren a la probóscide del díptero para repetir el ciclo de vida (Figura 2).

#### **2.1.1.1.1. Transición de promastigote a amastigote en *Leishmania***

La etapa de la deposición del parásito en el hospedero por parte del vector se denomina como fase metacíclica ya que las células flageladas que se desplazan al tejido linfático son conocidas como promastigotes metacíclicos (Almeida et al., 2003). Los promastigotes metacíclicos son células de alta motilidad que pueden desplazarse en largas matrices intracelulares ricas en colágeno, es por ello que en los seres humanos el tejido conjuntivo es uno de los tejidos más afectados y el daño ocasionado por la parasitosis puede ubicarse muy lejos del sitio de picadura (Petropolis et al., 2014). El parásito al entrar al tejido de interés, interactúa con las células del sistema inmune (macrófagos); varios estudios como el de Petropolis (2014), han demostrado mediante microscopía electrónica que el flagelo es la primera estructura en unirse con la membrana extracelular

del macrófago. Otros estudios también sustentan que el flagelo contiene algunos receptores extracelulares que pueden identificar algunas proteínas extracelulares exclusivas de los macrófagos, la interacción entre las dos células genera una serie de reacciones metabólicas de señalización en cascada para la región interna de la célula protozoaria conjunto a un movimiento constante por parte del flagelo ocasionando daños severos a la membrana extracelular del macrófago afectado, aumentando así la probabilidad de entrar e infectar a la célula de interés (Forestier et al., 2011; Sunter et al., 2017). Una vez dentro del macrófago, el promastigote modifica de forma muy importante su morfología disminuyendo considerablemente la longitud del flagelo mediante una serie de reestructuraciones. De manera alterna el parásito protozoario genera varias encapsulaciones intracelulares denominadas vacuolas parasitóforas en donde son estructuras ricas en enzimas proteolíticas a un medio de pH ácido (Antoine et al., 1990). Existen dos tipos de vacuolas parasitóforas que pueden formarse dentro de una célula hospedera, la vacuola del tipo "I" es aquella que tiene la capacidad de acarrear un solo parásito, la vacuola del tipo "II" o vacuolas comunales son las que tienen la capacidad de albergar más de dos parásitos en el medio (Real et al., 2010).

A nivel flagelar existen varios cambios moleculares que deben ser considerados. En el caso del axonema, este sufre cambios en su estructura microtubular antes y después de la fagocitosis (estructura "9+2" a "9+0/9v"), en el caso del bolsillo flagelar, existe un cambio en la conformación de las proteínas encargadas a la unión con la estructura flagelar; a pesar de dicha reestructuración no existe un aumento de espacio entre complejo principal de la célula y el flagelo (Wheeler et al., 2016).

Se sabe que la mayoría de células eucariontes flageladas tienen la capacidad de perder su flagelo finalizando un determinado ciclo, un ejemplo es el proceso de fecundación entre el espermatozoide y el óvulo. En el caso de las células de *Leishmania* ocurre de una forma muy diferente, debido a que los amastigotes no

pierden completamente su flagelo al estar dentro de la célula hospedera. Lo que muchos investigadores piensan que este también tiene un importante rol para la supervivencia del mismo (Sunter et al., 2017). Existen algunas investigaciones que identificaron que el flagelo de *Leishmania* pierde completamente su función motil en el momento de la fagocitosis y adquiere una nueva función sensorial, dicha función puede ser determinante en la supervivencia debido a que este puede identificar si la célula hospedera es “saludable” o no para una posterior reproducción. Es así que, tomando en cuenta los metabolitos clave de la célula afectada, el flagelo sensitivo debe estar en conformación “9+0” y debe tener un alto grado de acercamiento con la vacuola de la célula protista. (Gluenz et al., 2010). Existen algunos estudios que sostienen la afirmación de la actividad sensitiva de los flagelos “9+0” en los amastigotes. Un ejemplo es el uso de glucosa libre en el citoplasma de la célula hospedera por parte de las células de *Leishmania* mediante una proteína transportadora de la familia LmGT denominada LmGT1, en donde se ha examinado sus funciones principales con junto a otras dos isoformas (LmGT2 y LmGT3). A partir de dicha investigación se logró concluir una posible función sensitiva de LmGT1 debido a su ubicación estrechamente relacionada al axonema del flagelo tomando en cuenta que existen proteínas transmembranas de similar función en distintos organismos como *S. cerevisiae* y *N. crassa* (Burchmore et al., 2003; Gluenz et al., 2010). Otro ejemplo es la funcionalidad de otros receptores proteicos que detectan la presencia de nucleótidos como el adenosín trifosfato (ATP), en donde su presencia puede demostrar cuan “saludable” y “apta” es la célula hospedera para una posible reproducción amastigotes, en consecuencia: si una célula es saludable el amastigoto entrará en un estado activo para reproducirse, si una célula no es saludable el amastigoto se encontrará en un estado inactivo o de latencia (Sunter et al., 2017).

En el caso de la organización del reservorio flagelar ocurren una serie de pequeños cambios considerables entre las dos fases (promastigote – amastigote). Existen algunas excepciones en el cambio de la estructura conformacional del cuello, en donde el espacio se reduce al momento en que el

promastigote se adentra al macrófago de interés, en consecuencia, el collar también se contrae a  $0,4 \mu\text{m}$  generando así un área disponible en el bolsillo flagelar de  $0,01 \mu\text{m}^2$ , esto se debe a que el flagelo principal cambia su estructura de “9+2” a “9v”. La organización de los cuartetos microtubulares en los amastigotes es diferente a comparación de los promastigotes debido a que en los primeros existe una carencia de unos pocos microtúbulos (Wheeler et al., 2016). La disposición de las proteínas pertenecientes a la zona de unión al flagelo (FAZ) es diferente en la fase de amastigoto debido a que estas se pueden agrupar en tres dependiendo de su localización; el primer grupo se encuentra localizado entre la zona de constricción del cuello del reservorio y el citoplasma de la célula principal formando así un anillo en el medio, el segundo grupo está ubicado en la zona de formación del flagelo y el tercer grupo puede formarse en la zona proximal y distal del flagelo.

#### **2.1.4.1.2 Transición de amastigote a promastigote en *Leishmania***

El proceso de diferenciación de amastigote a promastigote se desarrolla una vez que el vector transmisor succiona sangre rica en macrófagos infectados con vacuolas parasitóforas (Figura 2). Para el proceso de diferenciación existen distintos elementos mediadores que permiten el desarrollo de los amastigotes. Se ha determinado que los factores abióticos como la temperatura y el pH son determinantes para el direccionamiento de las células para la biogénesis flagelar, y se conoce que a pH neutro en temperaturas de entre  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $37^\circ\text{C}$  son las condiciones óptimas para la diferenciación morfológica (Gadelha et al., 2013). Cabe mencionar que en esta transición existe un proceso de división mitótica en las células parasitarias, en consecuencia, también existe la formación de cuerpos intermediarios.

Una de las variaciones importantes que se debe tomar en cuenta en la transición, es la formación de un flagelo motil por cada célula. El periodo total para la formación completa de un flagelo activo de un largo de  $8 \mu\text{m}$  es de 24 horas, en

donde se ha determinado que entre las 4 a 6 horas de diferenciación se generan los cuerpos intermediarios nombrados anteriormente. A las 4.1 horas de iniciado el cambio morfológico, el flagelo comienza a emerger del reservorio con un diámetro promedio de 0,51  $\mu\text{m}$ , mucho antes del proceso de duplicación del kinetoplasto que se desarrolla a las 5.6 horas del proceso global (Gadelha et al., 2013). Durante ese periodo, los cambios moleculares a nivel del flagelo son muy variados, comenzando desde el reservorio, en donde existen variaciones en la localización de las proteínas FAZ dando lugar un espacio óptimo para el desarrollo de tubulinas que participarán en la biogénesis flagelar. En la biogénesis flagelar, el axonema sufrirá varios cambios que permitirán la formación de un flagelo del tipo "9+2" completamente motil (Wheeler et al., 2016). En los periodos de formación de células intermediarias la motilidad por parte del flagelo es regular ya que recién a las 6 horas de iniciado el proceso global el axonema apenas sufre elongación, conjuntamente con una producción inicial de proteínas paraflagelares (PFR) en donde son importantes para la inducción motil (Gadelha et al., 2013; Santrich et al., 1997).

A nivel de la estructura celular principal de *Leishmania*, encontramos varios cambios los volúmenes de los distintos organelos celulares. En el caso de la forma del amastigote, la densidad del volumen del núcleo celular es más del 11% del volumen celular a comparación de la fase del promastigote, en donde el núcleo ocupa un volumen celular del menos del 6% (Gadelha et al., 2013). Existen otros organelos que a diferencia del núcleo, aumentan su volumen en la transición a promastigoto, este es el caso de las mitocondrias, en donde en etapa de amastigote dichos organelos ocupan un volumen celular menor al 7%, al finalizar la transición existe un aumento en lo que es el proceso de biogénesis mitocondrial produciendo una alta cantidad de mitocondrias que ocupan hasta un 9% del volumen celular, este fenómeno se debe a que en fase de promastigote, la célula de *Leishmania* requiere más de energía química para proporcionar la motilidad en el flagelo (Gadelha et al., 2013; Käser et al., 2017). En el caso del kinetoplasto, el volumen celular es menor al 2% y no existe una variación para las formas de amastigote y promastigote, únicamente dicho

organelo duplica su volumen cuando las formas intermediarias se desarrollan entre las 4 y 6 horas del proceso de transición (Gadelha et al., 2013). Cabe mencionar que la duplicación del volumen del kinetoplasto se debe a la replicación del ADN para la repartición equitativa para las 2 células hijas producidas a partir de la mitosis celular (Sunter et al., 2017).

Ya definido el proceso de diferenciación, cabe señalar que los productos generados a partir de la transición siguen sufriendo distintos cambios morfológicos, es decir, que en forma de promastigote, *Leishmania* muestra distintos cambios a nivel de forma y comportamiento, incluso dentro del vector transmisor. Una vez reproducido y diferenciado el amastigote, los productos principales serán dos promastigote en fases procíclicas en donde uno tendrá un flagelo largo perteneciente al antiguo amastigote progenitor y el otro tendrá un nuevo flagelo, pero más corto generado en el proceso de mitosis (Rogers et al., 2002).

El promastigote procíclico generalmente está ubicado en los intestinos del vector, cabe mencionar que dicha célula también se encuentra en un medio de sangre encapsulada en una matriz peritrófica generada por el sistema digestivo del insecto después de la picadura al hospedero, es por ello que en esa etapa es de vital importancia que el protozoo tenga un flagelo completamente funcional y motil de entre 6,5  $\mu\text{m}$  a 11,5  $\mu\text{m}$  de largo, tomando en cuenta otros factores externos como la existencia de enzimas extracelulares como PpChit1 que son encargadas de estabilizar y degradar a la matriz peritrófica, permitiendo así el escape del parásito hacia el tejido intestinal del insecto (Coutinho-Abreu et al., 2010). Una vez fuera de la matriz peritrófica el promastigote procíclico se alarga convirtiéndose en un promastigoto nectomonado con un flagelo alargado de hasta 12  $\mu\text{m}$ , la razón principal del alargue del flagelo radica en la necesidad del enganche del mismo entre las microvellosidades encontradas en el tejido del sistema digestivo del vector. Además del enganche en las microvellosidades, cabe reiterar que el flagelo tiene funciones sensoriales que permiten mantener

informada a la célula protozoaria acerca de las características bioquímicas y fisicoquímicas del medio que la rodea, una función sensorial es la sensibilidad a la glucosa, dicha característica radica que la célula evolucionó paralelamente con respecto al desarrollo y alimentación del vector transmisor en donde además de la ingestión de sangre, los vectores saben tener dietas ricas en azúcares, en consecuencia la ingesta de monosacáridos genera una serie de reacciones mediadas por las proteínas receptoras de glucosa y otros monosacáridos ubicadas en el flagelo en donde informan a la célula cuando abandonar el enganche a las microvellosidades y cambiar su morfología hacia un promastigote leptomónado (Barros et al., 2006). El promastigote leptomónado a diferencia del nectomonado recorta la longitud de su flagelo a un rango de 6.5 a 11.5  $\mu\text{m}$  (como el promastigote procíclico) debido a que ya no requiere del enganche a las microvellosidades ubicadas en el intestino, además de ello, el promastigote leptomonado tiene una capacidad de desplazamiento hacia las válvulas stomodeales del insecto (Gossage, Rogers, y Bates, 2003). Estando en dichas válvulas, la célula puede tomar dos caminos. El primero es generar una fusión con las células de las válvulas cambiando su morfología a un promastigote haptomonado y el segundo es la maduración completa a un promastigote metacíclico. El promastigote metacíclico es la forma celular de *Leishmania* para una infección a un futuro hospedero (Rogers et al., 2002; Sunter et al., 2017).

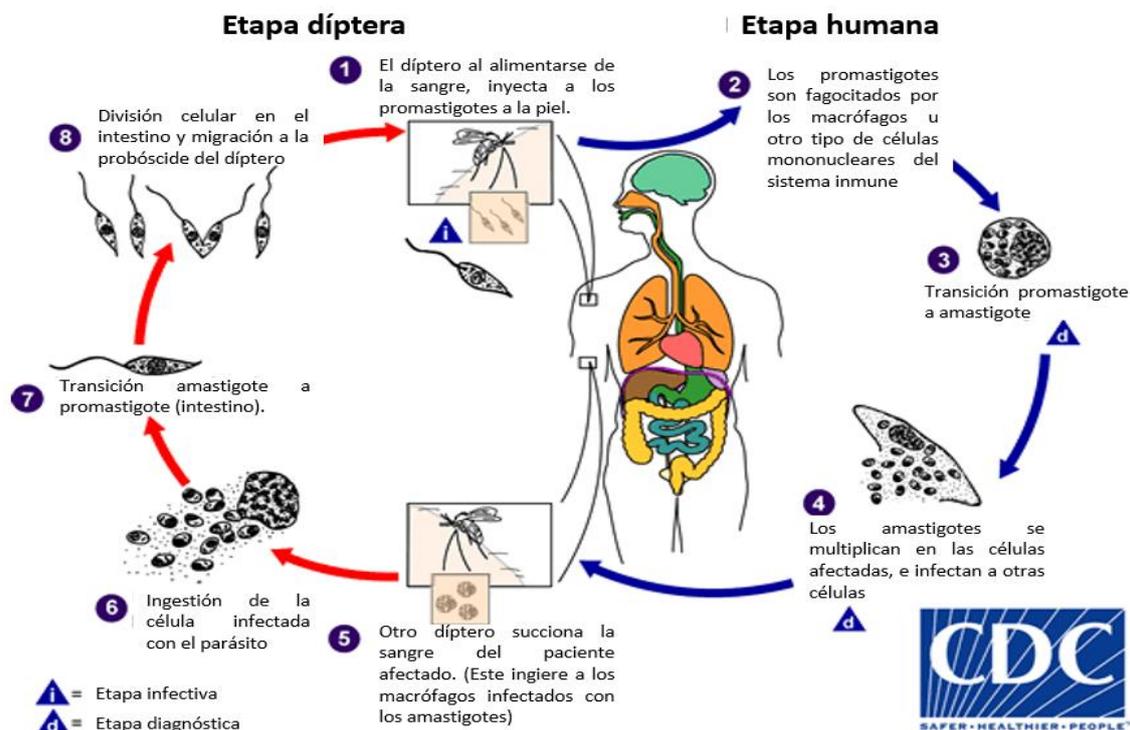


Figura 2. Ciclo vital del parásito protozoario perteneciente al género *Leishmania*.

Adaptado del (CDC, 2017)

## 2.2. La enfermedad: leishmaniasis

### 2.2.1. Distribución de las leishmaniasis a nivel mundial

Las leishmaniasis son enfermedades endémicas de los trópicos y los neotrópicos causadas por parásitos unicelulares del género *Leishmania* (Torres et al., 2017). A nivel mundial, dichas enfermedades han generado alto impacto en la salud pública de muchos países de climas tropicales y subtropicales produciendo entre 700.000 y 1 millón de nuevos casos, de las cuales entre 20.000 y 30.000 presentan fallecimiento (OMS, 2018). Estudios recientes han indicado que la distribución geográfica de dichas afecciones es muy amplia en los cuatro continentes más poblados del mundo (América, Europa, Asia y África) y su

transmisión depende de distintos elementos de carácter natural y social (Akhoundi et al., 2017) (Figura 3).



*Figura 3.* Distribución geográfica de leishmaniasis por países alrededor del mundo.

Adaptado de (Akhoundi *et al.*, 2017)

La transmisión de las leishmaniasis en el caso de los factores sociales puede ser influenciada por la excesiva pobreza de las distintas zonas rurales de los países afectados, debido a la deficiencia en el tratamiento de los desechos sólidos y un mal manejo en el sistema de alcantarillado de la zona (OPS, 2017). Otro punto a recalcar es la excesiva migración. Existen muchos casos, en donde miles de personas son desplazadas debido a guerras y escases de alimentos, lo que ocasiona el movimiento masivo de portadores y no portadores. Un ejemplo claro es el éxodo de 7 millones de sirios que huyeron a Turquía por causa de la guerra civil, de los cuales 4100 casos de leishmaniasis han sido reportados como enfermos en dicho país (Özkeklikçi et al., 2017). Debido al éxodo masivo, se ha determinado que las probabilidades del aumento de casos de leishmaniasis son altas debido a que los refugiados también se sitúan en zonas endémicas de las cuales abundan dípteros transmisores de distintas especies de *Leishmania* como *L. major*, *L. tropica* y *L. infantum* (Alten et al., 2016). En el continente americano,

el Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia ha determinado que la migración venezolana puede aumentar los casos de enfermedades parasitológicas en los países receptores de migrantes, como; Ecuador, Brasil, Perú, Colombia, Argentina, entre otros (MSPSC, 2018).

Dentro de los factores naturales, las leishmaniasis pueden ser transmitidas debido a los cambios climáticos en distintos ecosistemas como el aumento de la humedad relativa del medio, el aumento de precipitaciones, las variaciones drásticas de temperaturas y la disminución de la flora como la tala de bosques (OPS, 2017).

### **2.2.2. Distribución de las leishmaniasis en el Ecuador**

En el Ecuador, las leishmaniasis son enfermedades de alto impacto en la salud pública. La documentación de casos de leishmaniasis fue generada desde la época precolombina en el imperio inca gracias a descubrimientos arqueológicos de vasijas y huacos que demostraban Figuras humanas con lesiones en la piel, dichas lesiones documentadas en esas Figuras de cerámica se parecían a las lesiones que causa el parásito del género *Leishmania*, lo que determinó que las leishmaniasis existían mucho antes del arribo de los españoles en América (Alabedra, 1952). Para el año de 1986, se generaron los primeros reportes en el Ecuador de leishmaniasis, identificando los casos oficiales ubicados en los valles del río Paute, Alausí y Huigra (Alaba, 1992; Calvopiña et al., 2004). Desde la década de 1990 hasta el año 2004, se estableció que 20 de las 24 provincias del Ecuador presentaban casos de leishmaniasis, existiendo un alto grado de prevalencia de la enfermedad en el área costera del territorio (Calvopiña et al., 2006). Los años que tuvieron mayor cantidad de pacientes infectados fueron el año 1990 (3610 casos) y 2000 (2514 casos) (Calvopiña et al., 2004).

Entre los años 2010 y 2014 el Ministerio de Salud Pública (MSP) identificó un total de 6.608 casos de leishmaniasis con una tasa promedio anual de 1.321,6 casos (Kato et al., 2016). A finales del año 2014, se determinó que la mayor parte de casos de leishmaniasis aparecieron en la provincia de Pichincha con un 22,1% seguido de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas con un 12,5%, (MSP, 2014).

Para el año 2017, la cantidad de casos de leishmaniasis cambió drásticamente ya que los casos ascendieron a 1701 con una tasa de 10,14 casos por cada 100.000 habitantes. La región más afectada fue la costa ecuatoriana con una tasa de 166,76 casos por cada 100.000 habitantes, seguido por la región insular que tuvo una tasa de 148,2 casos por cada 100000 habitantes, la región andina y la Amazonía fueron las regiones con un menor número de personas afectadas (Figura 4) (Granda, 2017).

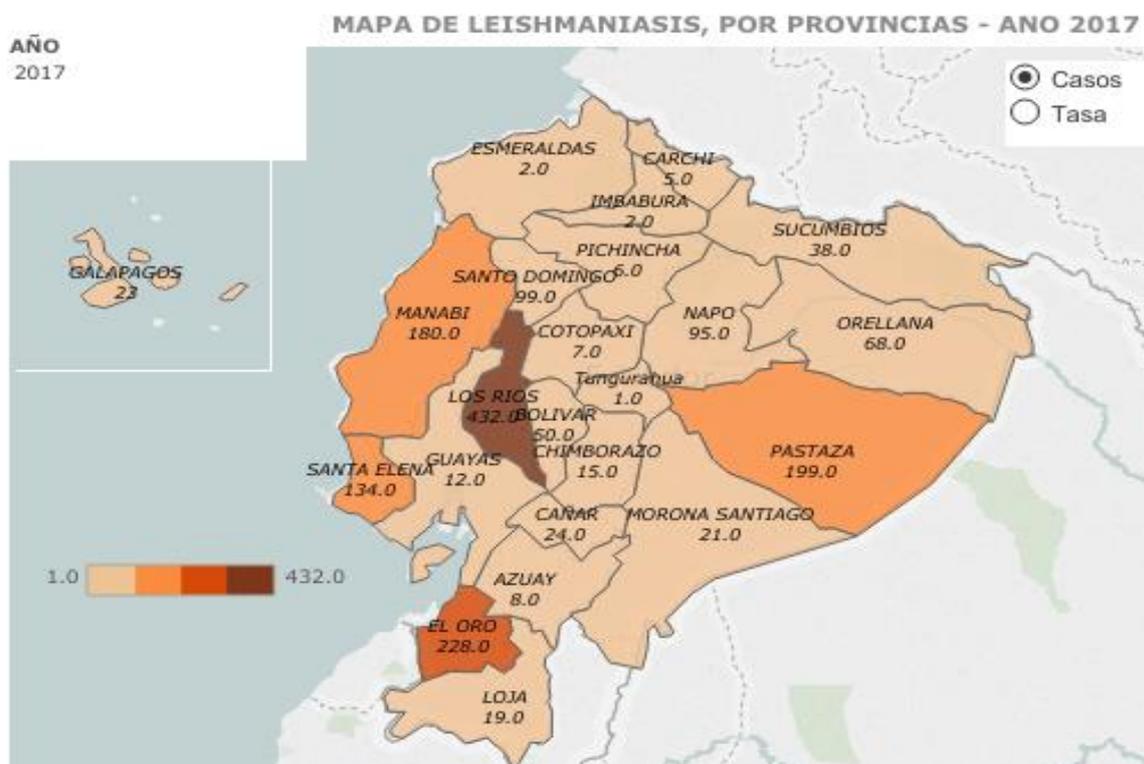


Figura 4. Casos de leishmaniasis reportados en Ecuador en el año 2017.

Tomado de (Granda et al., 2017)

### **2.3. El origen del género *Leishmania***

El origen y la aparición de parásitos protozoarios flagelados ha sido un tema de discusión actual en la parasitología moderna. Distintos descubrimientos fósiles han revelado la existencia de especies similares a las especies del género *Leishmania* en distintos estados morfológicos de la era prehistórica (Steverding, 2017).

#### **2.3.1. El origen del género *Leishmania* data desde eras geológicas antiguas**

Existen diversos debates en relación al origen geológico del género *Leishmania*. La postura original más acertada acerca del origen del parásito, es la evolución del protozoo en la era mesozoica, mucho antes de la división geológica del supercontinente Pangea (Soccol et al., 1993). A partir de dicha postura, se derivaron tres hipótesis que trataron de explicar el origen y desarrollo posterior del parásito protozoario. La primera es la hipótesis paleártica, en donde explica que *Leishmania* se desarrolló en los ecosistemas distribuidos en Europa, Asia y África (Kerr, 2000; Kerr, Merkelz, y MacKinnon, 2000; Lysenko, 1971; Steverding, 2017; Tuon et al., 2008). La segunda hipótesis es la neotropical, la cual sostiene que el desarrollo de *Leishmania* fue principalmente en América (Marshall, Webb, Sepkoski, y Raup, 1982; Noyes, 1998). Y La tercera hipótesis, es la del supercontinente, en donde sostiene que el género *Leishmania* se bifurcó inicialmente en tres subgéneros (*Viannia*, *Leishmania* y *Sauroleishmania*) a partir de la partición del supercontinente Pangea concordando con las afirmaciones de las dos hipótesis explicadas anteriormente (Akhoundi et al., 2017; Momen y Cupolillo, 2000; Steverding, 2017).

#### **2.3.2. Taxonomía del género *Leishmania***

La taxonomía del género *Leishmania* se encuentra dividida en dos grupos de los cuales abarcan seis subgéneros con sus especies respectivas (Mohammad Akhoundi et al., 2016) (Figura 5).

El primer grupo es denominado Euloleishmania, el cual tiene 4 subgéneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* y *Mundinia*. El subgénero *Leishmania* contiene un total de cuatro complejos (*major*, *tropica*, *donovani* y *mexicana*) de los cuales su origen se formó en los ecosistemas del viejo mundo (Europa, Asia y África), en el caso del complejo *mexicana*, a pesar de su prevalencia en el nuevo mundo; estudios han demostrado una estrecha relación genética con muchas especies del nuevo mundo (Momen y Cupolillo, 2000). A su vez, el subgénero *Viannia* presenta dos complejos (*braziliensis* y *guyanensis*) cuyo origen es en los ecosistemas del nuevo mundo (principalmente en América del Sur) soportando la afirmación de la hipótesis de Momen (2000). El subgénero *Sauroleishmania*, a diferencia de los otros, no presenta su división por complejos, debido a que sus veintiún especies presentan un sistema de adaptación única con respecto a diferentes especies de reptiles (Lozano et al., 2018). En el caso del subgénero *Mundinia*, es aquel que tiene especies que están dispersas en distintos ecosistemas y son prevalentes alrededor del mundo (Akhoundi et al., 2017).

Existen otras especies como *L. equatoriensis*, *L. colombiensis*, *L. hertigi* y *L. denaei* que son ubicadas en un grupo denominado Paraleishmania, dichas especies a pesar de los análisis genómicos, hasta el momento no pueden ser ubicados y divididos en géneros absolutos debido a que presentan inestabilidad en sus secuencias genéticas (Akhoundi et al., 2017).

De todas las especies pertenecientes al género *Leishmania*, se ha determinado que 21 son patogénicas para los seres humanos, de las cuales principalmente pertenecen a los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* (Akhoundi et al., 2016).

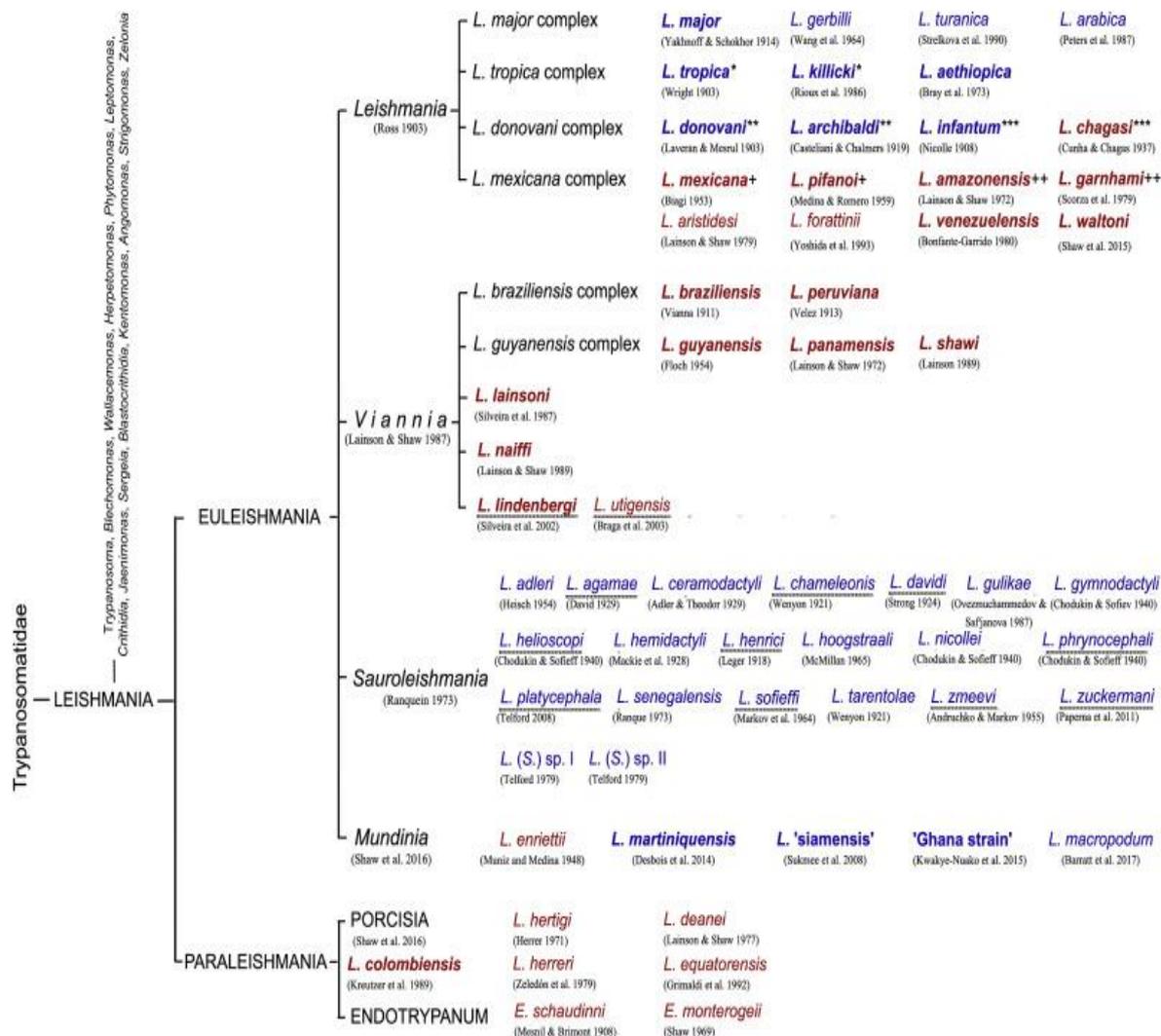


Figura 5. Clasificación taxonómica general del género *Leishmania*. Letras en azul representan especies pertenecientes al “Viejo Mundo”. Letras en rojo representan especies pertenecientes al “Nuevo Mundo”

Tomado de (Akhoundi et al., 2017)

### 2.3.3. Distribución mundial de las especies patógenas de *Leishmania*

Como se indicó en el capítulo 1 del presente documento, la distribución mundial de *Leishmania* es muy amplia y abarca a todos los países que contienen

ecosistemas húmedos o tropicales. La distribución de las 21 especies patógenas depende de su catalogación si pertenecen al viejo o al nuevo mundo.

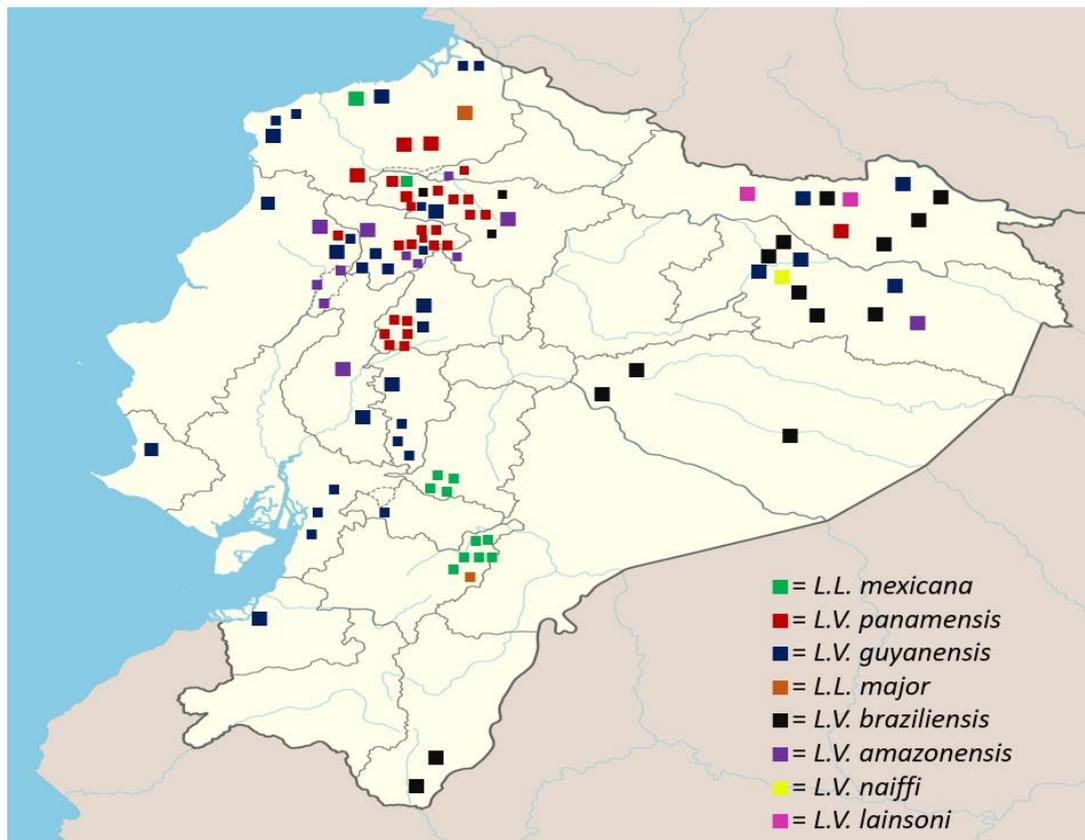
La distribución de las 21 especies de *Leishmania* patógenas para el hombre identificadas hasta el momento a nivel mundial es muy variada. El continente americano, a diferencia de los otros, contiene una alta variedad de especies desde la zona central de los Estados Unidos hasta la Argentina, las especies prevalentes son; *L. mexicana*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. colombiense*, *L. shawi*, *L. lainsoni*, *L. venezuelensis*, *L. naiffi* y *L. martiquensis* (Akhoundi et al., 2017). En Europa las especies prevalentes son; *L. infantum*, y *L. siamensis*. En África hay especies como *L. tropica*, *L. infantum*, *L. major*, *L. donovani*, *L. siamensis*, *L. martiquensis*. En el Medio Oriente especies como *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major* y *L. arabica* son las predominantes en países como Siria, Irak, Líbano, Kuwait y Arabia Saudita.

#### **2.3.4. Distribución de especies patógenas de *Leishmania* en el Ecuador**

Actualmente, en el Ecuador se han detectado varias especies patogénicas de *Leishmania* que prevalecen en distintas provincias, dichas especies pertenecen a los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* (Figura 6).

Diversos estudios en el Ecuador determinaron la distribución geográfica de las especies de *Leishmania* mediante el uso de técnicas moleculares. *L. mexicana* es una especie que se encuentra en provincias como; Esmeraldas, Azuay, Pichincha y Chimborazo. *L. guyanensis* se encuentra en las provincias de; Manabí, Esmeraldas, Los Ríos, Bolívar, Santa Elena, Pichincha, Cotopaxi, Guayas, Sucumbíos, Cañar y Orellana. *L. panamensis* se ubica en; Esmeraldas, Manabí, Imbabura, Pichincha, Santo Domingo, Cotopaxi y Sucumbíos. *L. major* se distribuye en dos provincias que son; Esmeraldas y Azuay. En las provincias

de Manabí, Imbabura, Orellana, Santo Domingo y Los Ríos se determinó la presencia de *L. amazonensis*. En el caso de *L. braziliensis* varios estudios determinaron que dicha especie prevalece en la región oriental en las provincias de Zamora Chinchipe, Pastaza, Orellana y Sucumbíos junto a la provincia de Pichincha. Las especies menos concurrentes son; *L. lainsoni* y *L. naiffi* que se ubican en las provincias de Sucumbíos y Orellana.



*Figura 6.* Distribución geográfica de especies de *Leishmania* en el Ecuador continental.

Adaptado de (Armijos et al., 1990; Calvopiña et al., 2006; Calvopiña et al., 2004; Kato et al., 2016; Kato et al., 2013)

## 2.4. Manifestaciones clínicas de las leishmaniasis

La presencia de parásitos del género *Leishmania* en un hospedero humano, puede generar tres formas clínicas generales que afectan la integridad de varios tejidos. Estas son: leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral. El desarrollo de las manifestaciones clínicas en un paciente se determina mediante dos elementos principales: la especie del parásito y el estatus inmunitario del paciente afectado (Stebut, 2015).

El primer elemento es la especie de parásito. Se ha determinado que varias especies tienden a generar un cuadro clínico en específico. Para la leishmaniasis visceral, las especies más concurrentes para el desarrollo de dicha manifestación son las que pertenecen al subgénero *Leishmania* como; *L. donovani*, *L. infantum*, y *L. tropica*. En el caso de la leishmaniasis mucocutánea, se identificó el dominio de especies pertenecientes al subgénero *Viannia*, entre las especies principales se encuentra; *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis* y *L. panamensis*. Para la leishmaniasis cutánea, generalmente existe el desarrollo de especies pertenecientes al subgénero *Viannia* y *Leishmania* debido a que la transmisión del parásito se da mediante la picadura de dípteros, en consecuencia, dicho cuadro clínico es universal para cualquier paciente afectado (Akhoundi et al., 2017).

El segundo elemento es el estatus del sistema inmunitario del organismo hospedero afectado. Es por ello que los pacientes inmunodeprimidos como personas con VIH, neonatos, niños y gente de la tercera edad son los más propensos a tener manifestaciones clínicas más severas, lo que ocasiona un alto nivel de dificultad en el tratamiento. Existen casos en donde los pacientes afectados fallecen debido al impacto de microorganismos oportunistas que aprovechan la situación deficiente del sistema inmunitario (Calvopiña et al., 2017)

#### **2.4.1. Leishmaniasis cutánea (LC)**

La LC es la manifestación clínica más prevalente a nivel mundial, de hecho, se ha detectado que el 90% de pacientes que tienen LC se encuentran ubicados en siete países distribuidos en el Medio Oriente, América del Sur, África y Asia. (Hepburn, 2003).

Los agentes causantes de la LC generalmente son especies de *Leishmania* pertenecientes a los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*. El impacto de la manifestación a los pacientes afectados depende principalmente del tipo de especie parasitaria, se sabe que las especies pertenecientes al “Viejo Mundo” generan pequeñas úlceras limitadas. En el caso de las especies del “Nuevo Mundo”, la severidad del cuadro clínico es completamente diferente, ya que se puede generar ulceraciones más profundas que pueden derivar a otros tipos de manifestaciones clínicas denominadas como leishmaniasis tegumentaria americana (ATL por sus siglas en inglés *American Tegumentary Leishmaniasis*) (de Vries et al., 2015; Martins et al., 2014).

Inicialmente, la LC ocasiona distintos nódulos en las zonas afectadas debido a la picadura del vector. Durante un periodo determinado desde semanas y hasta meses, el nódulo formado puede desarrollarse hasta generar una úlcera prominente en el tejido epitelial. Generalmente las úlceras tienen un borde elevado formando un contorno parecido a un volcán. Debido a la picadura, la zona afectada también puede proveer las condiciones necesarias para el crecimiento de bacterias que causan impetiginización (Stebut, 2015). En el caso de individuos inmunocompetentes, la severidad de las lesiones generalmente aparece en un periodo global entre 6 a 18 meses después de la picadura por parte del vector, es por ello que dicho cuadro clínico es asintomático.

Los cambios que se pueden desarrollar en los casos de leishmaniasis cutánea, pueden ser influenciados por el grado de severidad, la apariencia clínica, y el tiempo de curación espontánea en donde el paciente puede presentar diversos cuadros derivados (Reithinger et al., 2007).

El grado de severidad se determina mediante las características físicas de la lesión causada, como la longitud, el diámetro y la profundidad de la úlcera (Calvopiña et al., 2004). La apariencia clínica puede ser clasificada con 3 tipos de LC (Reithinger et al., 2007), que serán descritos a continuación:

El primer tipo es la LC clásica, que se caracteriza por el apareamiento de nódulos uniformes en el área afectada por la picadura del mosquito, la LC clásica puede presentar sintomatología en un periodo entre 2 y 78 días con una media de 17 días. Varios estudios han detectado algunas variaciones en la expresión del cuadro clínico de LC con respecto a las especies pertenecientes al nuevo y viejo mundo, en donde se ha llegado a concluir que el apareamiento de úlceras es mucho más rápido en el caso de una parasitosis relacionada con especies del nuevo mundo (Berman, 1997) (Figura 8).

El segundo tipo es la LC diseminada, la cual tiene la característica principal de presentar un sinnúmero de lesiones pleomórficas que aparecen en áreas corporales como el tronco, los brazos, la cara y las piernas, las lesiones pueden transformarse en úlceras de gran tamaño con un diámetro de hasta 29,1 milímetros en los pacientes afectados. A nivel proteómico, la producción de interferones (principalmente el interferón gama y alfa) es muy ineficiente a comparación de pacientes que tienen LC clásica, lo que genera un aumento de la gravedad de afectación del tejido (Turetz et al., 2002) (Figura 7).



*Figura 7.* Manifestación clínica tardía de leishmaniasis cutánea difusa en el cuerpo de un hombre infectado en Venezuela.

Tomado de (Zerpa y Convit, 2009)

El tercer tipo es la LC recidivante, cuya característica principal es el apareamiento múltiple de varios nódulos (pápulas y pústulas) alrededor de una cicatriz restablecida que puede ubicarse en cualquier zona del cuerpo como el cuello (Neitzke-Abreu et al., 2014). Otra característica de la LC recidivante es la aparición de granulomas angioplúpidos de consistencia húmeda que se pueden derivar a lesiones verrugosas y secas. Dichos granulomas se pueden localizar en varias zonas del rostro como debajo de la nariz (Meireles et al., 2017).



*Figura 8.* Manifestación clínica de leishmaniasis cutánea en el oído de una mujer infectada de 18 años de edad.

Tomado de (Calvopiña, Martínez, y Hashiguchi, 2013)

#### **2.4.2. Leishmaniasis kala-azar (LKA)**

También denominada como leishmaniasis visceral, es un cuadro clínico ocasionado por especies de *Leishmania* pertenecientes al subgénero *Leishmania*, las especies principales que ocasionan la LKA son; *L. infantum*, *L. donovani* y *L. chagasi*. La LKA se caracteriza por presentar sintomatologías como: fiebre, pancitopenia, hepatoesplenomegalia (Agrandamiento del hígado) y esplenomegalia (Agrandamiento del bazo) (Figura 9). Generalmente, los pacientes que padecen de LKA, presentan una concentración de hemoglobina desde 5 a 9 gramos por cada decilitro en un volumen de 2000 a 4000 mm<sup>3</sup>. La LKA se caracteriza por la presencia excesiva de parásitos protozoarios en órganos pertenecientes al aparato digestivo, debido a esa presencia, las células de los tejidos afectados empiezan a sufrir un aumento de volumen debido a las reacciones proinflamatorias generadas por el sistema inmunológico del individuo. Si la LKA no es tratada, la probabilidad de muerte del paciente afectado es muy alta (Berman, 1997). Un ejemplo es el estudio efectuado en

Sudán en donde de un total de 3076 pacientes afectados, hubo el fallecimiento de 336 personas (11%) (Seaman et al., 1996). Otros estudios generados en el mismo país también determinaron una alta incidencia de muerte en una tribu nómada, en donde de los 83 pacientes afectados, el 6% de los pacientes fallecieron por deficiencias derivadas de la leishmaniasis como; falla anémica del corazón, derrame intestinal, y fallo hepático (Hashim et al., 1994).

Existen tres tipos de LKA que se pueden presentar en los pacientes. Los tipos de LKA son: leishmaniasis visceral templada, leishmaniasis visceral dependiente del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido (SIDA), y leishmaniasis visceral sudanesa (Berman, 1997).

La leishmaniasis visceral templada, a su vez, es un cuadro clínico que muestra una sintomatología muy diferente a la LKA clásica ya que no se presenta una gran cantidad de escenarios de fiebre, no se genera ningún aumento considerable de órganos internos (organomegalia) y la concentración de hemoglobina en sangre se mantiene en sus niveles normales. A diferencia de la LKA, la LKA templada genera varios malestares como diarreas intermitentes, dolores abdominales, fatiga extrema, y tos. Existen casos en donde algunos pacientes no presentan ninguna sintomatología hasta los 2 años después de la recepción del parásito en el organismo (Magill et al., 1993).

La leishmaniasis kala-azar dependiente de SIDA (LKA-SIDA), es un cuadro clínico que puede ser comparado con la leishmaniasis kala-azar clásica, debido a que presenta casi la misma sintomatología (Montalban et al., 1989). La única diferencia que sobresalta la LKA-SIDA, es la ausencia de organomegalia en sus pacientes con junto a una afectación severa en el tracto gastrointestinal desde esófago hasta el recto (Hernández et al., 2018). Algunas investigaciones también han demostrado que el sistema inmunológico de algunos individuos contiene la cantidad necesaria de anticuerpos de reconocimiento a antígenos de algunas especies de *Leishmania*, lo que le confiere al individuo un grado importante de

resistencia ante el agente etiológico. Si estos pacientes tolerantes a *Leishmania* sufren una coinfección con VIH-SIDA, la inmunosupresión de células inmunológicas generará una señal de aviso para que los parásitos puedan ser reactivados y puedan desarrollarse, generando así un alto impacto en la inmunidad del sujeto que puede ser susceptible a cualquier agente oportunista (Alvar, 1994).

La leishmaniasis kala-azar sudanesa (LKA-S), es un cuadro clínico derivado de la LKA-clásica debido a su aparición en Sudán. La diferencia entre LKA-S y LKA-clásica radica en el apareamiento de sintomatologías neurológicas en los afectados, una sintomatología predominante es la sensación de quemadura en los pies. Se sabe que la LKA-S, tiene un mayor nivel de mortalidad a comparación de la LKA-clásica ya que se identificó la defunción de 100000 personas en el periodo de la década de los 90 (Seaman et al., 1996).



*Figura 9.* Manifestación clínica de leishmaniasis kala-azar en un paciente ugandés

Tomado de (Chappuis et al., 2007)

### **2.4.3. Leishmaniasis mucocutánea (LMC)**

La LMC, es el cuadro clínico que demuestra diversas afecciones severas a los tejidos que contienen membranas mucosas que forman parte del sistema respiratorio. Los tejidos más afectados son los de la nariz, laringe y la orofaringe (Berman, 1997; Saenz et al., 1991) (Figura 10). Los agentes etiológicos de la LMC son generalmente especies de *Leishmania* del nuevo mundo pertenecientes al subgénero *Viannia*. Las especies más predominantes son; *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, y *L. guyanensis* (Akhoundi et al., 2017; Stebut, 2015).

El desarrollo de la leishmaniasis mucocutánea puede durar un periodo de entre 2 a 10 años, en dicho periodo los parásitos adquiridos se movilizan por medio del líquido linfático del sujeto. Los tejidos que conforman la nariz, la laringe y la orofaringe están conformados principalmente por tejido cartilaginoso, es por ello que, en presencia del agente etiológico, esos tejidos sufren grandes daños obteniendo perforaciones en distintas áreas, conjunto a una fuerte obstrucción que genera un impacto en la función respiratoria del paciente. Las áreas afectadas son muy susceptibles ante infecciones ocasionadas por agentes oportunistas que pueden ocasionar la destrucción total del tejido ya que los macrófagos del sistema inmunológico se encuentran inhibidos por la excesiva producción de amastigotes en el medio (Berman, 1997; Fleeta Zaragoza et al., 2001; Stebut, 2015).



*Figura 10.* Manifestación clínica de leishmaniasis mucocutánea en el septum nasal de un paciente de 38 años

Tomado de (Calvopiña et al., 2006)

## 2.5. Diagnóstico, caracterización e identificación de *Leishmania*

### 2.5.1. El diagnóstico dirigido a *Leishmania*

El diagnóstico dirigido de *Leishmania* puede resultar complejo debido a la patología clínica que presenta la leishmaniasis. Las lesiones de la LC varían dependiendo de la severidad, cantidad, la apariencia clínica y la duración. En el caso de la LKA, no necesariamente aparecen los típicos cuadros clínicos de esplenomegalia o hepatomegalia ya que también depende si el agente etiológico es dermatópico o no. De la misma manera, la leishmaniasis mucocutánea también presenta diversas variaciones similares en sus cuadros clínicos (Calvopiña et al., 2017). Es por ello, que en el diagnóstico puede haber diversos sesgos como falsos positivos o falsos negativos.

En el diagnóstico de la leishmaniasis se pueden emplear principalmente tres métodos: la microscopía, la citología y el análisis molecular (Akhoundi et al., 2017). En el caso de la microscopía, se requiere de una biopsia inicial en inmunización en frotis sobre portaobjetos de tejidos afectados ya sea desde tejido linfático o del bazo. La visualización en el microscopio es facilitada por tinción de Giemsa de la muestra. La microscopía es conocida como una técnica simple y barata, pero su problemática radica en la ineffectividad en la diferenciación por especies ya que las mismas son morfológicamente similares (Akhoundi et al., 2013; Calvopiña et al., 2004).

En lo que respecta a la citología, el diagnóstico puede ser desarrollado por medio de reconocimiento en medios de cultivo *in vitro*. La técnica se basa en la extracción de una biopsia a partir de un tejido afectado, los parásitos existentes en la biopsia son acarreados a un medio de cultivo que contenga los elementos necesarios para el desarrollo vital del parásito de estudio. El análisis citológico puede presentar una ventaja para el mantenimiento del agente etiológico en condiciones controladas, pero demuestra varias desventajas ya que esta técnica

también depende de métodos moleculares *downstream*. Adicionalmente, para mantener un cultivo *in vitro* se requiere de gran cantidad de tiempo y de un área aséptica con equipamiento sofisticado (Emin et al., 1997).

Los diagnósticos moleculares a diferencia de los dos anteriores, requieren el análisis de macromoléculas como el ADN, ARN, enzimas, proteínas estructurales y metabolitos. La ventaja que presentan estas técnicas radica en la efectividad, la sensibilidad y precisión. La desventaja principal de los diagnósticos moleculares es el costo, ya que el proceso de desarrollo de los mismos requieren equipamiento sofisticado como termocicladores, secuenciadores, y equipos cromatográficos (Akhoundi et al., 2017).

### **2.5.2. Detección y caracterización molecular de *Leishmania***

Gracias a los avances tecnológicos desarrollados desde el descubrimiento del ADN por Rosalind Franklin, muchos investigadores especializados en el estudio de *Leishmania* pudieron entender la biología del agente etiológico conjunto a la innovación de nuevas técnicas de diagnóstico certero para la identificación del mismo. La caracterización de la leishmaniasis se divide principalmente en dos accionares: diagnóstico y de tipificación.

En el diagnóstico, por lo general se encuentran las herramientas usadas para; detección, identificación, discriminación y cuantificación. El objetivo principal de las herramientas de diagnóstico es el reconocimiento del agente causal de la enfermedad de interés, gracias a la identificación exacta del agente, los investigadores tendrán un panorama general de la evolución de los cuadros clínicos que se presentan en los pacientes afectados. A diferencia del diagnóstico, la tipificación tiene como objetivo analizar a mayor profundidad las características celulares del agente etiológico. Es por ello que la tipificación usa

distintas herramientas de mayor rendimiento y mayor precisión (Akhoundi et al., 2017).

En la actualidad, muchos investigadores usan herramientas derivadas de las ciencias ómicas para realizar sus estudios, como la genómica que permite el análisis a nivel genético de varios organismos como la organización y estructura de los genomas, la predicción de fenotipos a nivel molecular, el mapeo genético, y la comparación entre organismos (Cantacessi et al., 2015)

### **2.5.2.1. Genómica**

La genómica es una ciencia ómica que se encarga en el estudio comparativo de las secuencias completas del genoma de cualquier tipo de organismo. Principalmente la genómica puede derivarse en varios estudios, entre esos estudios se encuentra la genómica estructural. La acción principal de la genómica estructural es el enfoque para la formación de análisis de secuencias y mapeo genético, es por ello que en la genómica estructural se usan herramientas distintivas como, amplificación por medio de PCR, secuenciación, clonaje, cristalografía, y análisis de datos mediante programación bioinformática (Crommelin et al., 2013) Para el análisis de *Leishmania*, muchos investigadores usan distintas herramientas tanto para el diagnóstico y el de tipificación.

#### **2.5.2.1.1. PCR**

La PCR (por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*), es una técnica diseñada por Kary Mullis, cuyo objetivo es la creación de copias de hebras de ADN simulando de manera *in vitro* los principios de la replicación genómica. Una reacción de PCR se compone de cinco reactivos: Enzima polimerasa, cebadores, Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), cationes divalentes y amortiguadores químicos.

#### **2.5.2.1.1.1. PCR simple**

La PCR simple, es aquella que amplifica una región genómica mediante el uso de un solo par de cebadores.

A diferencia de la replicación *in vivo* en los organismos, la PCR simple simula dicho fenómeno en tres pasos críticos. El primer paso es la denaturación, en donde se usan temperaturas mayores a 95°C con el fin de romper los puentes de hidrógeno del ADN. El segundo paso es la hibridación, el cual los cebadores se unen a la cadena molde de ADN con el objetivo de dar inicio a la replicación *in vitro*. Y el tercer paso es la elongación, en donde la actividad catalítica de la enzima genera la polimerización de las cadenas mediante la adición de los dNTPs.

#### **2.5.2.1.1.2. PCR múltiple**

La PCR múltiple es una variante de la PCR simple, la cual no solo usa un solo juego de cebadores, sino usa de dos pares de cebadores en adelante. El objetivo principal de la PCR múltiple es analizar diversos marcadores moleculares de manera simultánea que pueden ubicarse en un mismo cromosoma o en varios respectivamente.

Uno de los estudios más prominentes es el uso de dicha técnica con la finalidad de detectar la presencia del agente etiológico con respecto a los distintos hospederos. En dicho estudio se han diseñado diversos cebadores discriminantes que pueden hibridarse en genes pertenecientes a los parásitos del género *Leishmania* y a los hospederos (mamíferos) (de Cássia-Pires, de Melo, Barbosa, y Roque, 2017).

### 2.5.2.1.2. Secuenciación

La secuenciación es una técnica molecular que permite caracterizar puntualmente el orden conformacional de los nucleótidos en una cadena de ADN. Muchos investigadores trataron de caracterizar las moléculas de ADN como es el caso de Maxam y Gilbert (1977) en donde secuenciaron una molécula de ADN mediante degradación química mediante enzimas de restricción (ER). El uso de ER era un proceso muy laborioso, es por ello que Sanger generó una nueva técnica de secuenciación utilizando nucleótidos inhibidores de elongación. Dichos compuestos son denominados como dideoxynucleótidos trifosfato, en donde en su estructura molecular no contienen terminaciones de grupo hidroxilo (-OH) que permitan la unión con otros nucleótidos posteriores, en consecuencia, los productos tendrán distintos pesos moleculares que pueden ser visualizados posteriormente en geles de acrilamida (Sanger et al., 1977). A partir de la secuenciación de Sanger, se generaron nuevas variantes de secuenciación permitiendo la entrada a las secuenciaciones de siguiente generación diseñadas a partir de distintas casas comerciales como Pacific Bioscience, Applied Biosystems, Oxford Nanopore Technologies, entre otros (van Dijk et al., 2018). Una de las variantes más usadas en secuenciación es la Secuenciación de Sanger con electroforesis capilar, en donde los productos con los dideoxynucleótidos fluorescentes pasan por un capilar con una determinada porosidad, dichos productos que emiten varias ondas de luz son procesados y transmitidos a una computadora permitiendo así la formación de un electroferograma (Dovichi et al., 2000).

Los resultados lanzados por el electroferograma pueden ser analizados en un proceso post – secuenciación. Para el desarrollo de dicho proceso, se requiere el uso de diversos análisis bioinformáticos. Generalmente, las secuencias obtenidas pasan a ser alineadas localmente o globalmente con otras secuencias de interés cuya finalidad es la generación de diversos análisis, como la descripción de la filogenia molecular de las especies, los patrones de

substitución nucleotídica, los eventos de duplicación genómica y la identificación de mutaciones que pueden generar productos disfuncionales (Smith y Waterman, 1981; Xia, 2007).

Para el análisis en *Leishmania*, la secuenciación ha sido aplicada en distintas ramas ya sea desde la identificación puntual del agente etiológico en pacientes afectados hasta en los análisis de genómica comparativa. En el Ecuador, uno de los estudios más prominentes es el de Olalla (2015), en donde se ha identificado por secuenciación la presencia de especies como *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. braziliensis* en pacientes que presentaron lesiones ulcerosas en distintas partes del cuerpo.

### **3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL**

El diseño del plan experimental se encuentra detallado en la Figura 11, en él se muestra tres análisis principales usados para el desarrollo del proyecto. El primer análisis constó en el análisis teórico y bioinformático de las secuencias de las especies de cada subgénero (*Leishmania* y *Viannia*). El segundo análisis fue la optimización de un sistema diagnóstico por PCR simple y múltiple. Finalmente, el tercer análisis constó en la aplicación de la PCR estandarizada para la detección de los agentes etiológicos en muestras de pacientes infectados.

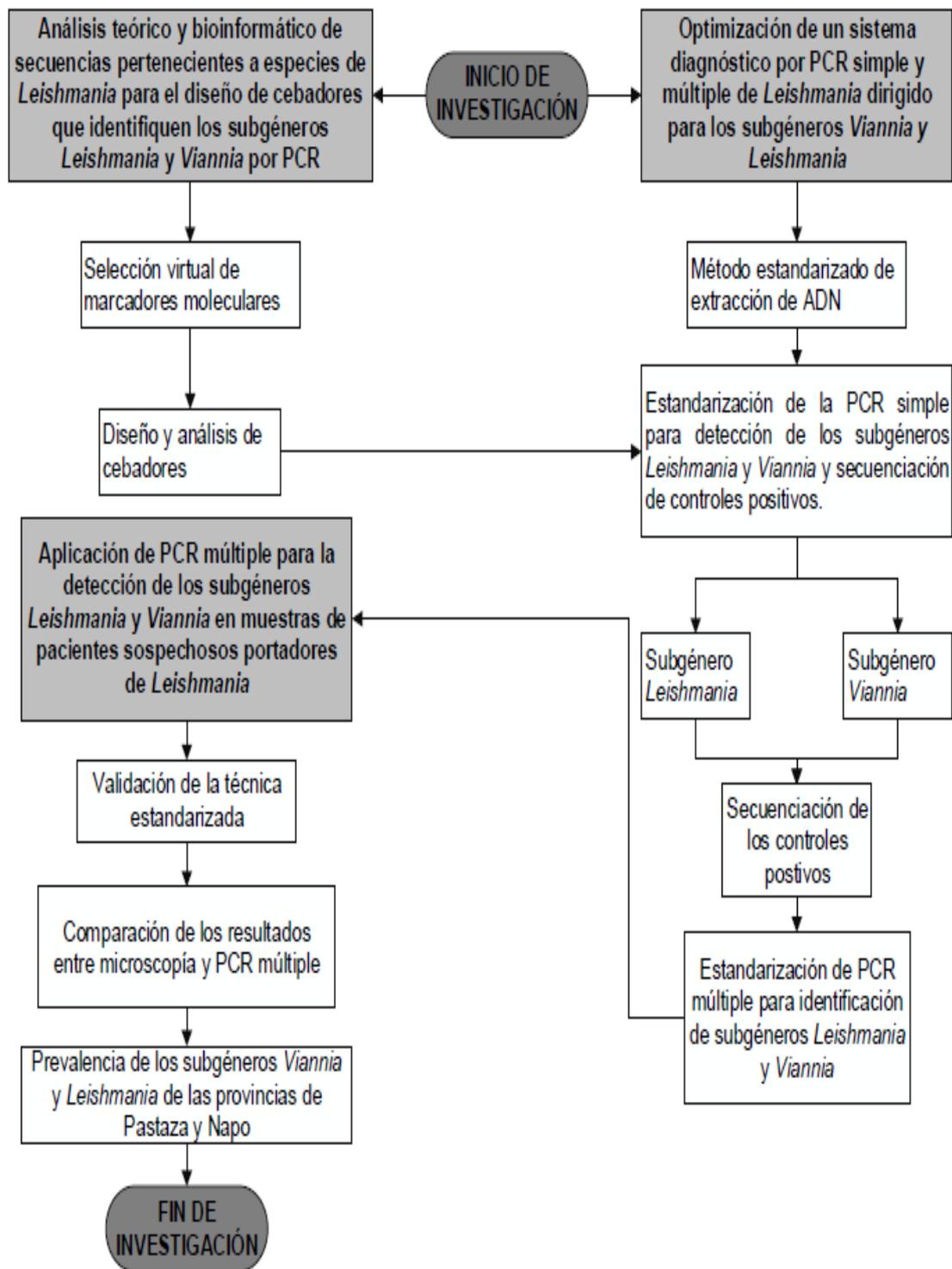


Figura 11. Diagrama de flujo vertical que presenta el diseño del plan experimental del proyecto de investigación para la diferenciación e identificación de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* mediante el uso del programa Visio.

## 4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

El presente proyecto fue desarrollado bajo la dirección del Dr. Manuel Calvopiña en la Dirección General de Investigación de la Universidad de las Américas bajo el código MED.MC.18.01 con la aprobación de los comités de bioética del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) Izquieta Pérez y de la Universidad Internacional de Ecuador (UIDE) (Cód. Ref.: CEISH-INSPI-013 y Cód. Ref.: CEU-069-18).

Los procedimientos en el proyecto de investigación se basaron en tres componentes principales; el primero fue el análisis teórico y bioinformático de secuencias pertenecientes a especies de *Leishmania* para el diseño de cebadores que identifiquen los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* por PCR, el segundo fue la optimización de un sistema diagnóstico por PCR simple y múltiple, y el tercero fue la aplicación en muestras obtenidas en pacientes sospechosos.

### **4.1. Análisis teórico y bioinformático de secuencias pertenecientes a especies de *Leishmania* para el diseño de cebadores que identifiquen los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* por PCR**

#### **4.1.1. Selección virtual de marcadores moleculares**

Se procedió a la investigación bibliográfica acerca de todos los genes (marcadores moleculares) utilizados para el análisis en *Leishmania* (Akhoundi et al., 2017).

A partir de la lista de marcadores moleculares, se efectuó una búsqueda en la base de datos *Gene Bank* proporcionado por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (por sus siglas en inglés *National Center of Biotechnology*

*Information*) (McEntyre y Ostell, 2002). Las secuencias nucleotídicas fueron agrupadas en una base de datos en formato Geneious

El alineamiento de secuencias se efectuó en el programa bioinformático Geneious, en el cual se realizó por medio de los algoritmos Mauve y Geneious (Darling, Mau, Blattner, y Perna, 2004; Kearse et al., 2012).

Se efectuó un alineamiento múltiple para las secuencias de los marcadores cromosómicos seleccionados (Anexo 1). En el caso de algunas especies, la disponibilidad de la secuencia nucleotídica de los marcadores moleculares era reducida a comparación de la secuencia cromosómica, es por ello que se decidió también usar el algoritmo Mauve para la identificación y posterior extracción del locus del marcador cromosómico. A partir del alineamiento múltiple por cada marcador, se procedió a extraer las secuencias *consensus* de cada marcador molecular. Para ese procedimiento, se utilizaron los siguientes números de ascensión de las especies, hasta el momento disponibles: *L. panamensis* (XM\_010705915.1) (EU289030.1), *L. guyanensis* (GQ180933.1), *L. peruviana* (LN609243.1), *L. braziliensis* (XM\_001562089.1), *L. donovani* (XM\_003865074.1), *L. major* (XM\_001686521.1), *L. infantum* (XM\_001469566.1), *L. mexicana* (XM\_003874297.1), *L. amazonensis* (Scaffold367\_10914..12212), *L. arabica* (CM004641.1), *L. aethiopica* (CM007213.1).

#### **4.1.2. Diseño y análisis de cebadores**

Se diseñaron los cebadores discriminantes de los dos subgéneros mediante el programa Geneious con el algoritmo Primer 3 (Remm y Koressaar, 2007) en base a las secuencias *consensus* previamente obtenidas.

A partir del diseño, inmediatamente se procedió a simular a nivel *in silico* los cebadores diseñados en el mismo programa determinando la secuencia producto oficial generada a partir de dicho procedimiento.

De manera simultánea se procedió a probar la especificidad de los cebadores mediante la aplicación del paquete bioinformático BLAST (Ye et al., 2012), con la finalidad de simular a nivel *in silico* el alineamiento de los cebadores en cadenas molde perteneciente a distintos organismos.

Si el cebador mostraba un sesgo de alineamientos con cadenas molde pertenecientes a especies de otros subgéneros, se rechazaba al cebador de estudio. Si el cebador demostraba una alta especificidad en especies pertenecientes a cada subgénero correspondiente, el cebador se aceptaba para el posterior análisis experimental en el laboratorio.

Los cebadores seleccionados fueron analizados bioinformáticamente mediante la herramienta *OligoAnalyzer* (IDT, 2018) con la finalidad de obtener las características fisicoquímicas y termodinámicas de los cebadores diseñados previamente.

## **4.2. Optimización de un sistema diagnóstico por PCR simple y múltiple de *Leishmania* dirigido para los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*.**

### **4.2.1. Población y Muestra**

Dieciséis muestras positivas por microscopía fueron destinadas para la estandarización de la PCR simple, estas fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) Izquierda Perez de las provincias del Napo (L-293-38-3) y Pastaza (L-287-39) por parte del Dr. Carlos

Chiluiza, las cuales consistían en frotis de sangre inmovilizados en portaobjetos teñidos con Giemsa para microscopía y todas presentaban un diagnóstico positivo para *Leishmania* por microscopía (Tabla 1). El permiso legal que permite el uso de dichas muestras posee el código de referencia CEISH-INSPI-013.

Tabla 1.

*Códigos de muestras positivas de presencia de Leishmania por microscopía de luz usadas para estandarización de la PCR simple.*

Localización	Código UDLA
Pastaza	Lesh_001
	Lesh_002
	Lesh_003
	Lesh_004
	Lesh_005
	Lesh_006
	Lesh_007
	Lesh_008
Napó	Lesh_009
	Lesh_010
	Lesh_011
	Lesh_012
	Lesh_013
	Lesh_014
	Lesh_015
	Lesh_016

A su vez para la validación de la técnica de PCR múltiple, además de las dieciséis muestras ya descritas, se usaron ciento veinticinco muestras, las cuales fueron también proporcionadas por el Dr. Jacob Bezemer, de las cuales, se procesaron

con la finalidad de verificar casos positivos de leishmaniasis. Las muestras constaron de líquido linfático procedente de pacientes sospechosos inmovilizado en papel FTA. El permiso legal que permite el uso de dichas muestras posee el código de referencia CEU-069-18.

#### **4.2.2. Preparación de las muestras para la extracción de ADN**

Las muestras, al estar inmovilizadas en portaobjetos, fueron removidas mediante raspado y posteriormente almacenadas en tubos Eppendorf® en alcohol al 99% a una temperatura de -20°C. Por otro lado, las muestras inmovilizadas con papel FTA fueron removidas mediante perforación para la posterior extracción de material genómico. Tras este procesamiento, se procedió con el protocolo descrito a continuación:

#### **4.2.3. Método de extracción estandarizado de ADN**

A partir de dicha preparación se procedió a la extracción de ADN. El presente protocolo fue estandarizado por Irina Villacrés Msc. en la Dirección General de Investigación de la Universidad de las Américas.

Para el protocolo, se adicionaron 100 µl de Chelex 100 en forma sódica (Sigma-Aldrich Co., St.Louis, Mo.) al 10% sobre la muestra de estudio. Luego se procedió a la homogenización de la mezcla mediante la inducción en vórtex (Fisher Scientific, EEUU) durante un periodo de dos minutos. A partir de ello se efectuó un proceso de centrifugación en una microcentrífuga (Eppendorf, Alemania) a 10000 revoluciones por minuto (rpm) durante un periodo de un minuto. Luego se agregaron 5 µl de Solución de Proteinasa K (PK) (Promega Corp., Madison, Wis.) al homogenato. Posteriormente se indujo a Baño María (Memmert, Alemania) durante un periodo de 1 hora a 56°C. Se realizó una segunda homogenización en vórtex (Fisher Scientific, EEUU) durante un periodo

de 15 segundos. A partir de la homogenización, se incubó la mezcla en un termobloque (Eppendorf, Alemania) a 95°C durante un periodo de 30 minutos. Ya incubada la mezcla, se realizó una segunda centrifugación en una microcentrífuga (Eppendorf, Alemania) a 10000 rpm en un minuto. Se extrajo el sobrenadante resultante y se lo transfirió a un tubo receptor. Se almacenó el producto obtenido en una congeladora (Eppendorf, Alemania) a -20°C.

#### **4.2.4. Cuantificación de ADN**

La cuantificación de ADN se ejecutó en un lector de placas (Bio Tek Instruments, Inc., EEUU). El protocolo de cuantificación fue aplicado siguiendo las indicaciones del fabricante. Inicialmente se colocó 1 gota de agua destilada a cada lado de una placa rectangular compuesta de vidrio y metal proporcionado por el fabricante, con la finalidad de limpiar y remover contaminantes. De manera continua, se adicionaron 2 µl de solución de Chelex 100 en forma sódica (Sigma-Aldrich Co., St.Louis, Mo.) sobre los dos primeros pocillos de la placa con el objetivo de blanquear al equipo. En el caso de las muestras de ADN, se agregaron 2 µl en los pocillos consiguientes. El proceso de cuantificación fue efectuado en el programa. Los datos fueron procesados y almacenados en un archivo Excel.

Para identificar la pureza de la muestra, se procedió a analizar cada muestra en un espectrofotómetro NanoDrop™ (Thermo Fisher, EEUU) en donde se consideraron las proporciones 260/280 y 260/30 con el fin de identificar presencia de agentes contaminantes.

En el presente estudio no se realizó un análisis de integridad genómica por electroforesis en geles de poliacrilamida debido a que la extracción de ADN se la efectuó con el protocolo de Chelex. El Chelex al ser una resina catiónica conjunto a la inducción en altas temperaturas, genera la disrupción de la doble

hélice del ADN produciendo hebras simples en el medio. En consecuencia, al generar un análisis electroforético, no se podrán visualizar las bandas debido a que los reactivos como SYBR® Safe únicamente tiñen para hebras dobles.

#### **4.2.5. Estandarización de la PCR simple para detección de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* y secuenciación de controles positivos.**

Para la amplificación de los marcadores moleculares seleccionados, se aplicaron los cebadores ICPB y INAGA de acuerdo a los resultados obtenidos a partir del análisis *in silico* generado en el apartado 4.1.2. del presente documento. Con la finalidad de disminuir el uso innecesario de reactivos, se procedió a optimizar las reacciones de PCR en un volumen final de 10 µl por muestra de estudio.

Para la optimización de la PCR simple, inicialmente se evaluó la temperatura óptima de hibridación de los cebadores mediante la aplicación de un gradiente de temperatura, generando una disminución y un aumento gradual de 2°C desde la temperatura de denaturación calculada *in silico* (Tabla 2).

Tabla 2.

*Condiciones de termociclador para la optimización de PCR convencional dirigida a la identificación de los subgéneros Leishmania y Viannia.*

<b>Ciclos</b>	<b>Proceso en termociclador</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Periodo</b>
1	Activación enzimática	94 °C	5 minutos
30-40	Denaturación inicial	94 °C	30 segundos
	Hibridación “Cebador – ADN molde”	(58°C – 62°C)	30 segundos
	Elongación	72 °C	1 minuto
1	Elongación final	72 °C	7 minutos

Por otro lado, para este ensayo, se usaron las condiciones de amplificación estándar descritas por el fabricante por duplicado, las concentraciones de cada reactivo se encuentran descritas en la Tabla 3.

Tabla 3.

*Concentraciones y volúmenes de reactivos recomendados por el fabricante para una PCR simple dirigida para identificación de los subgéneros Leishmania y Viannia*

Componente de reacción	Concentración inicial	Concentración Final	Volumen inicial (1 Rx)
Buffer (-MgCl <sub>2</sub> )	10X	1X	1 µl
Platinum® Taq ADN polymerase	5 UI.µl <sup>-1</sup>	1 UI.µl <sup>-1</sup>	0,2 µl
dNTP Mix	10 Mm	0,2 mM	0,2 µl
Cebadores	20 µM	0,3 µM	0,3 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	0,3 µl
H <sub>2</sub> O	-	-	6 µl
ADN	-	10 ng. µl <sup>-1</sup>	2 µl
Total	-	-	10 µl

Para continuar con la estandarización, se procedió a variar las concentraciones de los reactivos en los rangos descritos en la Tabla 4.

Tabla 4.

*Detalle de los gradientes de reactivos para optimización de reacciones de PCR convencional para los subgéneros Leishmania y Viannia*

PCR	Reactivo	Gradiente
PCR <i>Viannia</i>	Cloruro de Magnesio (MgCl <sub>2</sub> )	1,5 mM – 3 mM
	Nucleótidos (dNTP)	0,2 mM – 0,4 mM

PCR <i>Leishmania</i>	Platinum <sup>®</sup> Taq ADN polymerase	1 UI.µl <sup>-1</sup> - 1,3 UI.µl <sup>-1</sup>
	Cebadores	0,2 µM – 0,5 µM

Se comprobó en todos los ensayos, la amplificación de los fragmentos mediante electroforesis en geles de agarosa (Utrapure TM Agarose, Invitrogen) al 2%, las cuales se corrieron a 100 voltios durante 30 minutos (Labnet International, EEUU). La fotodocumentación de estos geles se efectuó en el equipo ChemiDoc™ Imaging Systems (Biorad, EEUU).

#### 4.2.5.1. Secuenciación de los controles positivos

A partir de la comprobación e identificación de la efectividad en las PCR convencionales estandarizadas, se procedió a secuenciar los fragmentos amplificados en un analizador de secuencias 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EEUU). La secuenciación fue efectuada por el servicio de secuenciación de la Universidad de las Américas. Los fragmentos secuenciados fueron analizados *a posteriori* en programas bioinformáticos como BLAST (McGinnis y Madden, 2004) y Geneious (Kearse et al., 2012) con el objetivo de verificar que la secuencia amplificada correspondía con los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* respectivamente.

#### 4.2.6. Estandarización de PCR múltiple para identificación de subgéneros *Leishmania* y *Viannia*

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la amplificación de los marcadores moleculares seleccionados por separado, y la verificación de las secuencias de los controles positivos, se procedió a estandarizar una PCR múltiple. Como control positivo, para este fin, se realizó una coinfección artificial,

que constó en la mezcla de los dos materiales genómicos provenientes los subgéneros *Viannia* y *Leishmania* respectivamente.

Inicialmente se evaluó la temperatura óptima de hibridación del conjunto de cebadores mediante la aplicación de un gradiente de temperatura, generando una disminución y un aumento gradual de 2°C tomando en cuenta la temperatura media de hibridación de entre los cebadores ICPB y INAGA (Tabla 5), usándose las concentraciones de reactivos mostradas en la Tabla 6.

Tabla 5.

*Condiciones de termociclador para la optimización de PCR múltiple dirigida a la diferenciación entre los subgéneros Leishmania y Viannia.*

Ciclos	Proceso en termociclador	Temperatura (°C)	Periodo
1	Activación enzimática	94 °C	5 minutos
30-40	Denaturación inicial	94 °C	30 segundos
	Hibridación "Cebador – ADN molde"	(58°C – 64°C)	30 segundos
	Elongación	72 °C	1 minuto
1	Elongación final	72 °C	7 minutos

Tabla 6.

*Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para estandarización de PCR múltiple dirigida a la diferenciación entre los subgéneros Leishmania y Viannia.*

Componente de reacción	Concentración inicial	Concentración final	Volumen inicial (1Rx)
Buffer (-MgCl <sub>2</sub> )	10X	1X	1 µl

Platinum® Taq ADN polymerase	5 UI.µl <sup>-1</sup>	1,5 UI.µl <sup>-1</sup>	0,3 µl
dNTP Mix	10 mM	0,6 mM	0,6 µl
Cebadores	20 µM	0,5 µM	1 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2,5 mM	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	-	-	4,6 µl
ADN	-	10 ng. µl <sup>-1</sup>	2 µl
Total	-	-	10 µl

Para continuar con la estandarización, se procedió a variar las concentraciones de los reactivos en los rangos descritos en la Tabla 7 del presente documento, con la finalidad de mejorar la resolución de los fragmentos amplificados.

Finalmente, con el objetivo de verificar la especificidad de los cebadores, se realizó una prueba cruzada en donde se utilizó el ADN perteneciente a cualquiera de los dos subgéneros con el objetivo de observar la existencia de amplificaciones inespecíficas.

Tabla 7.

*Gradientes de concentración de reactivos utilizados para optimización de reacciones de PCR múltiple dirigida a la diferenciación entre los subgéneros Leishmania y Viannia.*

Componente de reacción	Concentración	Gradiente
Buffer (-MgCl <sub>2</sub> )	1X	N/A
Platinum® Taq ADN polymerase	-	1,5 UI.µl <sup>-1</sup> – 1,7 UI.µl <sup>-1</sup>
dNTP Mix	Gradiente	0,6 mM – 0,8 mM
Cebadores	Gradiente	0,5 µM – 0,7 µM
MgCl <sub>2</sub>	Gradiente	2,5 mM – 2,7 Mm
H <sub>2</sub> O	-	-

ADN	10 ng.µl <sup>-1</sup>	N/A
-----	------------------------	-----

Se comprobó la amplificación de los fragmentos mediante electroforesis en geles de agarosa (Utrapure TM Agarose, Invitrogen) al 2%, las cuales se corrieron a una carga de 100 voltios durante 30 minutos (Labnet International, EEUU). La fotodocumentación de estos geles se efectuó en el equipo ChemiDoc™ Imaging Systems (Biorad, EEUU) al igual que en los procedimientos anteriores.

#### **4.2.7. Aplicación de PCR múltiple para la detección de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* en muestras de pacientes sospechosos portadores de *Leishmania***

##### **4.2.7.1. Validación de la técnica estandarizada**

Las dieciséis muestras que mostraron los resultados positivos por microscopía para la presencia de *Leishmania* fueron procesadas mediante la técnica de PCR múltiple estandarizada con la finalidad de determinar el nivel de confiabilidad de la técnica.

##### **4.2.7.2. Comparación de los resultados entre microscopía y PCR múltiple**

Se aplicó la técnica estandarizada en las 125 muestras restantes que fueron proporcionadas por el Dr. Jacob Bezemer. Se generó un cuadro comparativo global incluyendo las dieciséis muestras usadas para la estandarización con los resultados obtenidos entre la microscopía y la PCR múltiple. Se realizó un análisis estadístico descriptivo, comparando la sensibilidad en donde es el coeficiente entre los valores verdaderos positivos (VP) con respecto a la sumatoria de los valores verdaderos positivos con los valores falsos positivos (FP) (Ecuación 1) y especificidad en donde es el coeficiente multiplicado entre

los valores verdaderos negativos (VN) con respecto a la sumatoria entre los valores verdaderos negativos con los falsos positivos (FP) (Ecuación 2) entre la microscopía convencional con respecto a la PCR múltiple diseñada a un nivel de confianza del 95% en donde  $p$  es la proporción de estudio (Sensibilidad o Especificidad),  $Z_{\alpha/2}$  es el valor crítico de la distribución normal estándar y  $N$  es el tamaño muestral (Ecuación 3) (Bravo-Grau y Cruz, 2015).

$$\%Sens = \frac{VP}{(VP + FP)} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\%Esp = \frac{VN}{(VN + FP)} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$I.C. 100(1 - \alpha) = p \pm z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{p(1 - p)}{N}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

#### 4.2.7.3. Prevalencia de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania* de las provincias de Pastaza y Napo

Se realizó un cuadro comparativo utilizando únicamente los resultados que presentaron una concordancia entre la técnica microscópica y la técnica por PCR múltiple.

También se determinó descriptivamente el porcentaje de la presencia de cada subgénero con respecto al número total de pacientes infectados.

Finalmente, se aplicó el estadístico chi cuadrado con la finalidad de verificar la dependencia o independencia entre la presencia del agente etiológico con respecto al género de los pacientes sospechosos portadores de la enfermedad,

mediante la aplicación del paquete estadístico SPSS. El análisis estadístico se realizó a un nivel de confianza del 95% con un valor crítico de  $X_{\alpha}^2 = 3,814$ .

## 5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Análisis teórico y bioinformático de secuencias pertenecientes a especies de *Leishmania* para el diseño de cebadores que identifiquen los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* por PCR

#### 5.1.1. Selección de marcadores moleculares

Luego del análisis bioinformático se obtuvieron dos marcadores moleculares óptimos que permitieron la discriminación entre los dos subgéneros del parásito protozoario *Leishmania* (*Leishmania* y *Viannia*). Los marcadores moleculares seleccionados pertenecen a los genes *cpb* y *nagA*, los cuales son considerados como “genes constructivos”, y codifican para enzimas importantes en el mantenimiento de la integridad celular. Los marcadores *cpb* y *nagA* fueron usados para la identificación de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania* respectivamente (Figura 12).

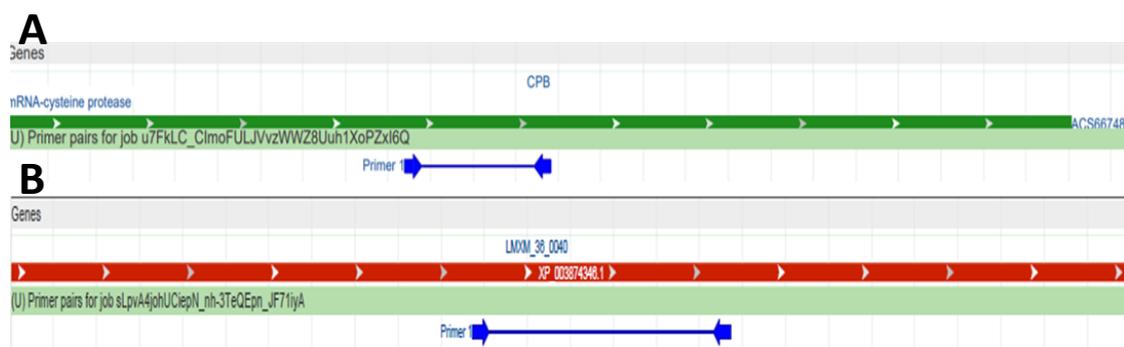


Figura 12. Marcadores moleculares seleccionados *in silico* para la discriminación entre los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* e identificación de regiones de amplificación con cebadores diseñados virtualmente, mediante el uso programa BLAST (Ye et al., 2012).

A. Marcador molecular *cpb* dirigido para la identificación del subgénero *Viannia*.

B. Marcador molecular *nagA* dirigido para la identificación del subgénero *Leishmania*.

Después del alineamiento de secuencias, se pudo obtener una secuencia *consensus* por cada gen. La secuencia *consensus* perteneciente al marcador molecular *cpb* para la identificación del subgénero *Viannia* se encuentra plasmada en la Figura 13 y subrayado se muestran los sitios blanco escogidos sobre los cuales se realizó el diseño de cebadores.

El gen *cpb* mostró ser adecuado para la discriminación del subgénero *Viannia* debido a que en el análisis de alineamiento múltiple se obtuvo un alto nivel de conservación. El grupo de Pérez (2007) realizó la identificación de especies de *Leishmania* pertenecientes al subgénero *Viannia* mediante RFLPs (por sus siglas en inglés *Restriction Fragment Length Polimorfisms*) con la enzima Taq1 que reconoce sitios 5' - T↓CGA - 3'. En dicho estudio han detectado que las especies presentan un patrón de similitud de corte alto, pero con la diferencia que la especie *L. peruviana* presentó un producto de tamaño distinto. El gen *cpb* además de demostrar alto nivel de conservación, se sabe que también es conocido como un gen que presenta gran cantidad de copias en un mismo locus dependiendo de la especie de *Leishmania* (Hide et al., 2008), lo que permite una

alta disponibilidad al ser amplificado por PCR. Conociendo que existen otros estudios que detectaron niveles de polimorfismos en dicho gen como la CTE (Extensión de la región carboxilo terminal), se han diseñado cebadores de la región codificante del dominio maduro de la catepsina, no considerándose las regiones de alta variabilidad nucleotídica (Hide et al., 2008; Hide et al., 2007)

```

1           10           20           30           40           50
|           |           |           |           |           |
ATGRCGGTGCCGAGGGTCTTCTGTGTGTTGTTGCGGCTGTGTGCGTGCT
GCTGGCGGCTGCCGGCGTGCCTGCGCRAGCGATGYACGTRGGCAGGCCGG
TCTCTGTGCTRTTCGAGGAGTTCAAGCAGACGTACMAGCGCGTGTACGCG
ACGCTGGMCGAGGAGCAGCAGCGGSTGGCGAACTTCCAGCGYAACTGGA
GCTGATGCGCGAGCACCAGGCGAACCAACCACACGCGCGGTTTCGGGATCA
CGAAGTTCTTTGACCTGTTCGGAGGMAGAGTTCGCCACGCGCTACCTGAGC
GGCGCCACGCACTTCGCAAAGGCGAAGAAGTTCGCAWGCNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGTGGACTGGCGTS
AGAWGGGCGCCGTGACGCCGGTGAASGACCAGGGGGRYGTGCGGGTTCATGC
TGGGCGYTCTTCGGCGATCGGCAACATAGAGTCGMAGTGGTACSTTRCCAC
CCACTCGCTGATYWCCYTGTTCGGAGCAGGAGCTGGTGAGCTGCGATGATG
TGGACGAGGGCTGCAACGGCGGCCTGATGCTGCAGGCRTTYGACTGGCTG
CTGRACAATARGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGYTAGCTACCCCTACGT
GTCYGGTAATGGYAGTGTGCCCGAGTGCTTCGGAGAGTAGTGAMCTCGTTR
TCGGTGCATACATCGATGGCCATGTGACGATCGAGAGCAACGAAGATACG
ATGGCTGCGTGGCTTGCGGYGAACGGTCCCATCGCTATTGCGGTTGACGC
CAGTGCCTTCATGTTCGTACACGGGSGGCRTCTGACCTCGTGCGATGGTA
RACAGCTGAACCACGGTGTGCTGCTCGTTGGGTACAACATGACYGGCGAG
GTTCCGTACTIONGGCTGATCAAGAACTCGTGGGGTRAGAACTGGGGCGAGAA
GGRCTACGTGCGCGTTCGCAAGGGRACGAACGAGTGCCTGATCCAGGAGT
ACCCCGYVTCYGCGCAGACGTCCGGCAGTACCACCCCTGGTCCSACSACS
ACGACGAAAGCCCCAAGGGCTTGGYGGTGGTKSNNNNNNNCGYRMASCGA
YTATKTCKGCMKVAANNRTGCARKGAKNAGGTGNNCMR.SWCGADCMANG
TGNNCTWCRRNGAGNNNYAHRGGGSGCMAAKSSGWKRS.GANTKCANNNNN
NNNTGCGSYMTGARSGAGGTGYTCRTGCGCAYCTATCCGAGCAGCGATTG
CAGYGGYACSCMGSRRRTAYRRHGT.SATWSSYGABGSYRWSTSTV.TGRWGW
YSWYBKSYGGCTYVRRCAWGAGNNNCAWCNTGCMYGYAAGTAG

```

Figura 13. Secuencia *consensus* del gen *cpb* obtenido en base de los alineamientos de especies pertenecientes al subgénero *Viannia* con el programa bioinformático Geneious (Kearse et al., 2012) mediante el algoritmo Geneious. Los sitios blanco para la amplificación se encuentran subrayados en color rojo.

Por otro lado, la secuencia *consensus* perteneciente al marcador molecular *nagA* se encuentra plasmada en la Figura 14 y subrayado se muestran los sitios blanco escogidos sobre los cuales se realizó el diseño de cebadores.

El gen *nagA* mostró ser el más óptimo ya que de la misma manera se determinó su nivel de conservación mediante los alineamientos múltiples. Se tomó en cuenta las afirmaciones impuestas por Momen (2000) quien indica los niveles de conservación, similitud y variabilidad entre las especies del género *Leishmania*, en donde describió que algunas especies del complejo *Mexicana* como *L. mexicana* y *L. amazonensis* a pesar de pertenecer al Nuevo Mundo, presentan características genómicas relativamente relacionadas con las especies del subgénero *Leishmania* perteneciente al Viejo Mundo.

```

1      10      20      30      40      50
|      |      |      |      |      |
ATGGRCAACGYTACGRTTATYAAGGGTAACATCGTSACGACCTCRAAGGT
SCTMTACGGYGGMTGTGTMATYGTGCGTRAATGATCTMATTGYVTCKGTGT
GTGRCAATGAGRCTSTTGYCCGAAARKASCTCGKYGAGCTCGAGARYACG
CAYCCMGGCRTAGGCGCGGCCACCTGGYAMGAGGCCGCRTTTGTGCTYCC
TGGGTTTCGTRGATATTCACAACCACGGAYTGGGYGGTGCRAGCGATGTGA
TWGGGCACTGGTCVAACCCAGAGTACTCCCTRAAGGAGCTGGCYCGGTGC
GGCACGCTSACRACCTTGGCGTCCRTCATCTTCTCCGAYAGCCACAAGAA
ACTGGTGACGGASTGTATTGATGCIYATCGAGAAGCGYGTGGGGWCCATA
CGRARGACAACCTGTATYYTGGGCGGYATCCATGCCGAGGGCCCCGTCATT
CACGACCGCGGGCGGCCTSCCGGARTGCAAGAGTGAAATRAGCCTCGRCGA
CTTCAAGCGGCTCGTCRAYTCTATGCCRTCCTTGCGCGTCATGACCATCT
CGCCMCACATCGAKGCACGGTGYAACTACGAGAAGRTAMGSYAYCTSCTS
RAGAAGAAGGTGCGCGTYGCSCTCGGGCAYGACCGCGCCGCCWCCAAGTC
GGAGATYATGKGCICYCTCAAGCTGGCRRRCSTCGGAGGAGGAGAAGATGC
ATGTYACCCACTTGTGYAACGTCTCCACSTTCAATCACCGTGCCAGCTCA
CTGGTGAACRCGGCCATGTGYCCGCGGTTYCCGAACGCSCCRCTCTACAA
AGGKGCICYCCGCCAACGCTGGAGATCATTGCTGATCTYATTCATGTYG
ATAGCGTCACACTKCAGTCYGTCCGKCGTCACGCAGCGTYGASGACATT
GCCATYATCACRGACTGYATCTCSGCACACATCCCTGGCAAGCAYGTGGT
GTACAACGGGCGTGACAGCGTYGTGCAGGGCGGGTGGGGCGTGCTATCTCT
GYGACTCKTTTGGYCGCGGTCCARCACTGGCKGGCGGCACKAGCATG
CTAGCCGACCTGTTCCATATCCTKATCACACTCTTCKGYAAGGATGTCGT
CGAGGCCTGCTTGCACACCGCCACCGTKCCCGCCCGMATCGCGAACCTKC
CYGACGTGGGYGCRATCRCTGWGRGAAAGAAGGCCAATCTKCTYCTTTTT
GACGCGGAGCTCMACACRATCGAGAAGCGCATGATTYACGGACASTGGAC
CTCGCACAAARCCGTACRSATYCTYACCCCTCTGTARYCCATCTGTGA

```

Figura 14. Secuencia *consensus* del gen *nagA* obtenido en base de los alineamientos de especies pertenecientes al subgénero *Leishmania* con el programa bioinformático Geneious (Kearse et al., 2012) mediante el algoritmo Geneious. Los sitios blanco para la amplificación se encuentran subrayados en color rojo.

Una de las principales características que presentan las especies del subgénero *Leishmania* pertenecientes al Nuevo Mundo, es la disminución considerable en su cariotipo. Por ello, el gen *nagA* mostró ser el más óptimo ya que está presente en el cromosoma 36 de las especies del Viejo Mundo y también en el cromosoma 20 de las especies del Nuevo Mundo, los alineamientos del gen *nagA* presentaron un alto nivel de homología entre las especies del Viejo Mundo con las del Nuevo Mundo, corroborando la afirmación propuesta anteriormente (Figura 15).

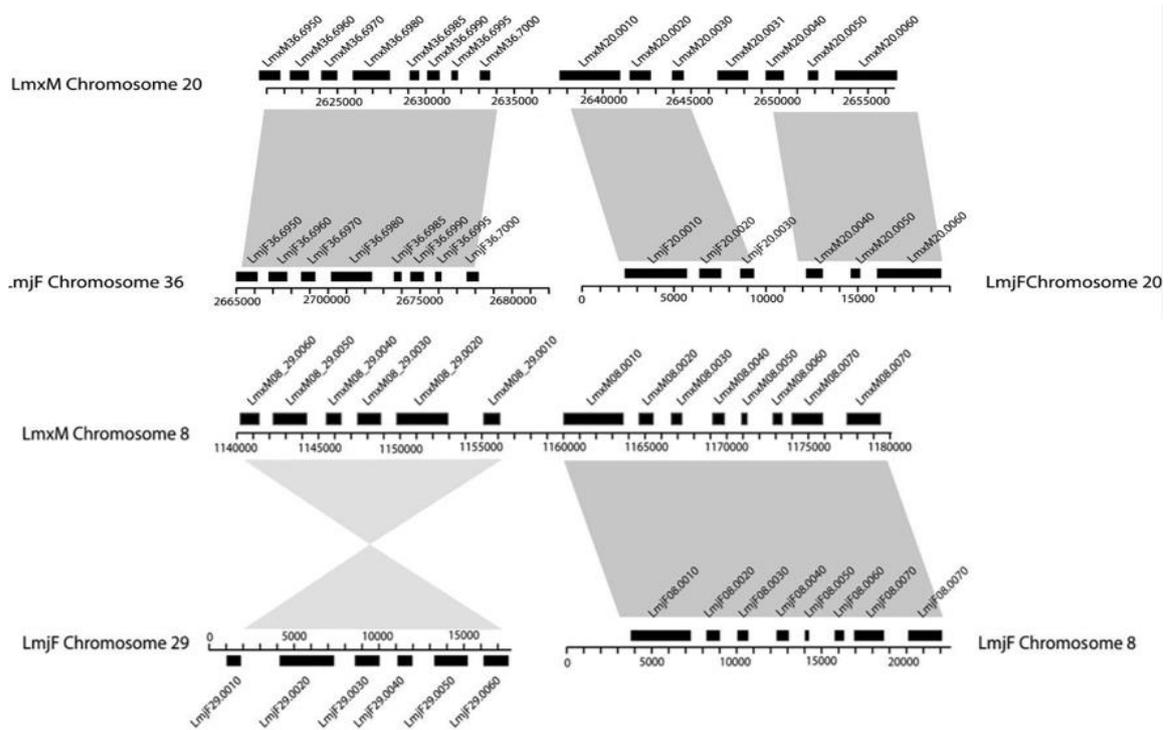


Figura 15. Fusión cromosómica y conservación genómica entre los cromosomas 20 – 36 y 8 – 29 efectuada en la especie *L. mexicana*. Se demuestra que la especie *L. major* presenta un alto grado de homología, concluyendo que las especies del Viejo Mundo son predecesoras a las del Nuevo Mundo (*L. mexicana* y *L. amazonensis*).

Tomado de (Britto et al., 1998)

## 5.1.2. Diseño y análisis de cebadores

### 5.1.2.1. Subgénero *Viannia*

En el caso del marcador molecular *cpb*, se obtuvo un par de cebadores que son discriminantes para este subgénero, dichos cebadores se encuentran especificados en la Tabla 8 con sus respectivas características cualitativas y termodinámicas. El programa bioinformático Geneious demostró mediante una PCR *in silico* que los cebadores diseñados pueden hibridarse fácilmente con respecto a la cadena molde perteneciente al gen *cpb* (Figura 16).

Tabla 8.

*Determinación de los parámetros fisicoquímicos estimados de los cebadores dirigidos para discriminación del subgénero Viannia en el programa OligoAnalyser (IDT, 2018).*

Parámetro	Cebador Forward		Cebador Reverse	
Nombre	ICPB-F470		ICPB-R641	
Secuencia	GCAACATAGAGTCGMAGTGG		TAGCTARCACCCGTGTACA C	
Temperatura de denaturación (°C)	Mínima	53,2 °C	Mínima	54,1 °C
	Media	54,6 °C	Media	55,2 °C
	Máxima	56,0 °C	Máxima	56,4 °C
Longitud (pb)	20 pb		20 pb	
Amplicón (pb)	172 pb			
Horquillas* ( <i>kcal. mol<sup>-1</sup></i> )	$\Delta G$ 3'	1,14 <i>kcal. mol<sup>-1</sup></i>	$\Delta G$ 3'	0,47 <i>kcal. mol<sup>-1</sup></i>
	$\Delta G$ Interna	0,54 <i>kcal. mol<sup>-1</sup></i>	$\Delta G$ Interna	0,43 <i>kcal. mol<sup>-1</sup></i>
Homodímero* ( <i>kcal. mol<sup>-1</sup></i> )	$\Delta G$ 3'	-3,14 <i>kcal. mol<sup>-1</sup></i>	$\Delta G$ 3'	-10,24 <i>kcal. mol<sup>-1</sup></i>

	$\Delta G$ Interno	$-7,54 \text{ kcal.mol}^{-1}$	$\Delta G$ Interno	$-5.54 \text{ kcal.mol}^{-1}$
Heterodímero* ( $\text{kcal.mol}^{-1}$ )	$\Delta G$ 3'	$-3,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$		
	$\Delta G$ Interno	$-3,61 \text{ kcal.mol}^{-1}$		

Nota: \*Valores más bajos y estables de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) en  $\text{kcal.mol}^{-1}$ .

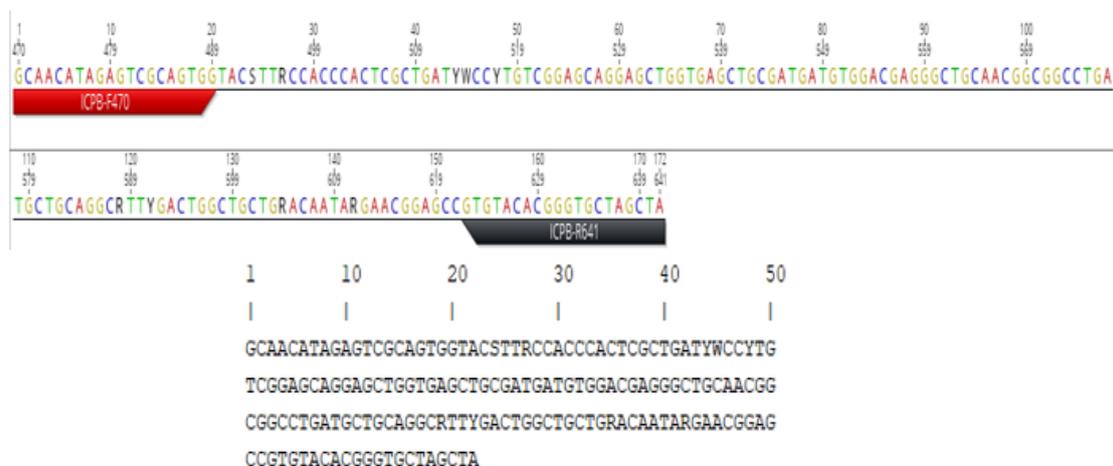


Figura 16. Simulación de PCR *in silico* dirigido al subgénero *Viannia* en el paquete bioinformático Geneious (Kearse et al., 2012) con el uso de cebadores ICPB-F470 y ICPB-R641.

Parte superior: Hibridación de cebadores en la cadena molde consenso y extracción *in silico* del producto PCR.

Parte inferior: Secuencia oficial del producto extraído.

El programa BLAST demostró que la hibridación de los cebadores ICPB únicamente ocurre en especies pertenecientes al subgénero *Viannia*, y no presentan inespecificidad de hibridación con respecto a las otras especies del subgénero *Leishmania* (Anexo 2).

### 5.1.2.2. Subgénero *Leishmania*

Para el marcador molecular *nagA*, a su vez se obtuvieron resultados positivos que permitieron discriminar únicamente a especies pertenecientes al subgénero *Leishmania*. Los cebadores selectos para diferenciar dicho subgénero se encuentran especificados en la Tabla 9 con sus respectivas características cualitativas y termodinámicas.

Tabla 9.

*Determinación de los parámetros fisicoquímicos estimados de los cebadores dirigidos para discriminación del subgénero Leishmania en el programa OligoAnalyser (IDT, 2018).*

Parámetro	Cebador Forward		Cebador Reverse	
Nombre	INAGA-F537		INAGA-R836	
Secuencia	CGTCATGACCATCTCGCCM		TCAGCAATGATCTCCAGCGT	
Temperatura de denaturación (°C)	Mínima	57,4 °C	Mínima	56,6 °C
	Media	57,8 °C	Media	56,6 °C
	Máxima	58,3 °C	Máxima	56,6 °C
Longitud (pb)	19 pb		20 pb	
Amplicón (pb)	300 pb			
Horquilla* <i>kcal.mol<sup>-1</sup></i>	$\Delta G$ 3'	N/A	$\Delta G$ 3'	N/A
	$\Delta G$ Internas	0,24 <i>kcal.mol<sup>-1</sup></i>	$\Delta G$ Internas	-1,66 <i>kcal.mol<sup>-1</sup></i>
Homodímero* <i>kcal.mol<sup>-1</sup></i>	$\Delta G$ 3'	-3,61 <i>kcal.mol<sup>-1</sup></i>	$\Delta G$ 3'	-3,61 <i>kcal.mol<sup>-1</sup></i>
	$\Delta G$ Internos	-11,22 <i>kcal.mol<sup>-1</sup></i>	$\Delta G$ Internos	-4,62 <i>kcal.mol<sup>-1</sup></i>
Heterodímero* <i>kcal.mol<sup>-1</sup></i>	$\Delta G$ 3'	-6,75 <i>kcal.mol<sup>-1</sup></i>		
	$\Delta G$ Internos	-5,00 <i>kcal.mol<sup>-1</sup></i>		

Nota: \*Valores más bajos y estables de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) en *kcal.mol<sup>-1</sup>*.

El programa bioinformático Geneious demostró que los cebadores discriminantes del subgénero *Leishmania* pueden hibridarse fácilmente con respecto a la cadena molde perteneciente al gen *nagA* (Figura 17)

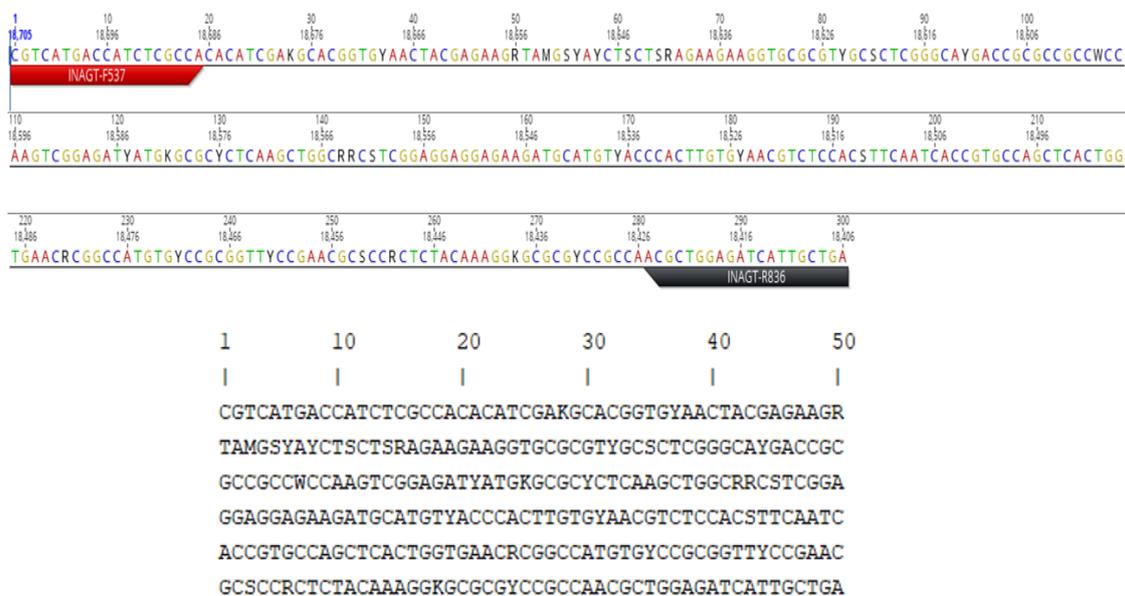


Figura 17. Simulación de PCR *in silico* dirigido al subgénero *Leishmania* en el paquete bioinformático Geneious (Kearse et al., 2012) con el uso de cebadores INAGA-F537 y INAGA-R836.

Parte superior: Hibridación de cebadores en la cadena molde consenso y la extracción *in silico* del producto PCR.

Parte inferior: Secuencia oficial del producto extraído.

El programa BLAST demostró que la hibridación de los cebadores INAGA ocurre únicamente en especies pertenecientes al subgénero *Leishmania* no presenta inespecificidades con otras especies del subgénero *Viannia* (Anexo 2).

A pesar de observar la existencia de especies del viejo mundo en el análisis con el algoritmo BLAST, se puede apreciar que no existe una hibridación *in silico* con respecto a la especie *L. amazonensis* (Anexo 2), esto se debe a que los datos del proyecto de secuenciación genómica de dicha especie hasta el momento no

han sido procesados y diferenciados en el NCBI. Por ello, se corroboró la fidelidad de los cebadores diseñados con los ensamblajes proporcionados en la página web diseñada en el proyecto de secuenciación de *L. amazonensis* con el ensamble Scaffold367\_10914..12212 verificándose su efectiva hibridación. Otro punto a recalcar radica en que el genoma de *L. amazonensis* al encontrarse estrechamente relacionado con el genoma de *L. mexicana*, conjuntamente con los genomas de las especies pertenecientes al Viejo Mundo, puede implicar que las secuencias nucleotídicas de esas especies no pudieron tener una alta divergencia, lo que significa que su nivel de conservación puede ser alto (Real et al., 2013).

De manera similar, las especies *L. aethiopica* y *L. arabica*, no mostraron una hibridación *in silico* de los cebadores en el programa ya mencionado. Esto pudo deberse a que la información genética de la mayoría de los marcadores moleculares de estas especies no ha sido procesada y diferenciada por el NCBI. En el presente proyecto, con el objetivo de abarcar el análisis en las especies nombradas, optó por el uso de las secuencias cromosómicas de las mismas, identificando el locus del marcador molecular usado para la diferenciación. Por lo consiguiente, se obtuvo la secuencia de estudio que posteriormente fue usada en una simulación de PCR *in silico* probando los cebadores previamente diseñados. Como resultado, se observó que los cebadores se hibridaron correctamente.

Por otro lado, para subgénero *Viannia*, también se pudo observar que no existió hibridación de los cebadores diseñados con las especies *L. lainsoni* y *L. naiffi*. Esto pudo deberse que, de la misma manera, el *Gene Bank* no haya procesado la información generada a partir de los proyectos de secuenciación masiva de dichas especies. En el caso de la especie *L. lainsoni* el proyecto de secuenciación genómica *shot gun* ha determinado que la secuencia genómica de dicha especie tiene un largo superior de 34 millones de pares de bases dividido en 137 contigs. Por otro lado, el proyecto de secuenciación de la especie

*L. naiffi* ha determinado que dicha especie contiene un largo superior de 30 millones de pares de bases dividido en catorce mil contigs (Coughlan et al., 2018; M. A. De Almeida et al., 2018).

El análisis fisicoquímico de los cebadores se encuentra en las Tablas 8 y 9. Dados los valores fisicoquímicos calculados para cada par, se usó como rango mínimo el valor de  $\Delta G = -9 \text{ kcal.mol}^{-1}$  para verificar fisicoquímicamente si los cebadores fueron o no teóricamente óptimos para una reacción de PCR (Prediger, 2018).

Para los cebadores *ICPB* se determinaron distintos valores en sus estructuras secundarias. Las horquillas obtuvieron valores desde  $0,43 \text{ kcal.mol}^{-1}$  hasta  $1,14 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . Los homodímeros presentaron valores desde  $-10,24 \text{ kcal.mol}^{-1}$  hasta  $-3,14 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . Y los heterodímeros revelaron valores desde  $-3,61 \text{ kcal.mol}^{-1}$  hasta  $-3,61 \text{ kcal.mol}^{-1}$ .

En el caso de los cebadores *INAGA* se obtuvieron los siguientes valores en sus estructuras secundarias. Las horquillas mostraron valores desde  $-1,66 \text{ kcal.mol}^{-1}$  hasta  $0,24 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . Los homodímeros presentaron valores desde  $-11,22 \text{ kcal.mol}^{-1}$  hasta  $-3,61 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . Y los heterodímeros obtuvieron valores desde  $-6,75 \text{ kcal.mol}^{-1}$  hasta  $-5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ .

Consecuentemente, los valores termodinámicos en las estructuras secundarias como horquillas y heterodímeros de los dos pares de cebadores demostraron estar dentro de los rangos óptimos o aceptables para que los cebadores puedan funcionar en una reacción de PCR. Por otro lado, los valores de los homodímeros para los dos pares de cebadores presentaron valores fuera del rango óptimo. Sin embargo, esto no significó un impedimento en la adecuada ejecución de la PCR, la cual se realizó con una acertada hibridación, esto pudo deberse a que la

inducción de temperaturas altas en el termociclador pudo influenciar en la estabilidad termodinámica de los mismos.

## **5.2. Optimización de un sistema diagnóstico por PCR simple y múltiple de *Leishmania* dirigido para los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*.**

### **5.2.1. Cuantificación de ADN**

En base a los resultados mostrados en la Tabla 10 de las dieciséis muestras usadas para la estandarización de la PCR, se observó que las concentraciones finales de material genómico recolectado eran desde 39 ng.µl<sup>-1</sup> hasta 153 ng.µl<sup>-1</sup> lo que indicaba que el método de extracción de ADN fue muy efectivo. La razón principal del porque se extrajo elevadas cantidades de ADN radica en que el Chelex al ser una resina catiónica que contiene iones de iminodiacetato, tiene la capacidad de unirse extracelularmente a las membranas celulares (membrana externa, mitocondrial y nuclear), provocando su ruptura completa conjunto a la liberación de todos los componentes intracelulares como proteínas estructurales, enzimas y ADN.

Sin embargo, los valores obtenidos en las proporciones 260/280 y 260/230 demostraron ser muy bajos a comparación de los límites estándar que debe presentar una muestra para su posterior procesamiento. En el caso de las proporciones 260/280, existieron valores menores a 1,34, lo que indicaba que en las muestras pudo haber la presencia de remanentes proteicos intracelulares y extracelulares. Por otro lado, del mismo modo, las proporciones 260/230 demostraron valores mucho más bajos que oscilaban entre 0,17 hasta 0,3 mostrando la presencia principalmente de carbohidratos (Desjardins y Conklin, 2010). La obtención de valores muy bajos en la cuantificación pudo deberse al escaso nivel de eficacia del protocolo para la purificación del ADN obtenido ya que no se usaron herramientas de purificación como columnas cromatográficas o reactivos precipitantes como el acetato de amonio y acetato de sodio (Budelier

y Schorr, 1998; Singh, Kumari, y Lyengar, 2018). No obstante, diversos estudios, han aplicado la extracción de ADN con Chelex demostrando que tiene un mejor rendimiento posterior en el procesamiento en PCR a comparación de otras técnicas de extracción de ADN como la extracción mediada por amortiguador químico Tris-EDTA (TE) y la extracción mediada con agentes purificantes de papel FTA con uso de Tris-EDTA (Miranda et al., 2012).

Tabla 10.

*Cuantificación y determinación de pureza genómica por NanoDrop™ y Lector de Placas de muestras utilizadas para estandarización de PCR simple, dirigida a la identificación y diferenciación entre los subgéneros Leishmania y Viannia.*

Origen	Código	Concentración ADN	Ratio 260/280	Ratio 260/230
Pastaza	Lesh_001	55,845 ng.ul <sup>-1</sup>	1,03	1,03
	Lesh_002	142,669 ng.ul <sup>-1</sup>	1,38	1,38
	Lesh_003	153,402 ng.ul <sup>-1</sup>	1,26	1,26
	Lesh_004	90,454 ng.ul <sup>-1</sup>	1,08	1,08
	Lesh_005	135,067 ng.ul <sup>-1</sup>	1,4	1,4
	Lesh_006	78,19 ng.ul <sup>-1</sup>	1,34	1,34
	Lesh_007	80,58 ng.ul <sup>-1</sup>	1,03	1,03
	Lesh_008	47, 61 ng.ul <sup>-1</sup>	0,82	0,82
Napo	Lesh_009	72,707 ng.ul <sup>-1</sup>	1,07	1,07
	Lesh_010	99,423 ng.ul <sup>-1</sup>	1,22	1,22
	Lesh_011	59,367 ng.ul <sup>-1</sup>	0,96	0,96
	Lesh_012	92,535 ng.ul <sup>-1</sup>	1,13	1,13
	Lesh_013	39,062 ng.ul <sup>-1</sup>	0,93	0,93
	Lesh_014	76,008 ng.ul <sup>-1</sup>	1,18	1,18
	Lesh_015	58,29 ng.ul <sup>-1</sup>	0,92	0,92
	Lesh_016	59,77 ng.ul <sup>-1</sup>	1,04	1,04

## 5.2.2. Estandarización de la PCR simple para detección de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* y secuenciación de controles positivos.

### 5.2.2.1. Subgénero *Viannia*

Con la estandarización de la PCR convencional usando los cebadores ICPB-F470 y ICPB-R641 se determinó que las condiciones mostradas en las Tablas 11 y 12 son ideales para la amplificación del producto deseado. Dichos cebadores tuvieron la capacidad de generar un fragmento de 172 pares de bases (pb) (Figura 19).

Tabla 11.

*Condiciones de PCR simple optimizada en un termociclador Eppendorf para identificación del subgénero Viannia*

Ciclos	Proceso en termociclador	Temperatura (°C)	Periodo
1	Activación enzimática	94 °C	5 minutos
40	Denaturación inicial	94 °C	30 segundos
	Hibridación "Cebador – ADN molde"	62 °C	30 segundos
	Elongación	72 °C	1 minuto
1	Elongación final	72 °C	7 minutos

Tabla 12.

*Concentraciones y volúmenes de reactivos de la PCR simple optimizada dirigida al subgénero Viannia*

Componente de reacción	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final (1Rx)
Buffer (-MgCl <sub>2</sub> )	10X	1X	1,0 µl

Platinum <sup>®</sup> Taq ADN polymerase	5 UI.µl <sup>-1</sup>	1 UI µl <sup>-1</sup>	0,2 µl
dNTP Mix	10 mM	0,2 mM	0,5 µl
ICPB-F470	20 µM	0,3 µM	0,15 µl
ICPB-R641	20 µM	0,3 µM	0,15 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	0,3 µl
H <sub>2</sub> O	-	-	6,0 µl
ADN	-	10 ng µl <sup>-1</sup>	2,0 µl
Total	-	-	10 µl

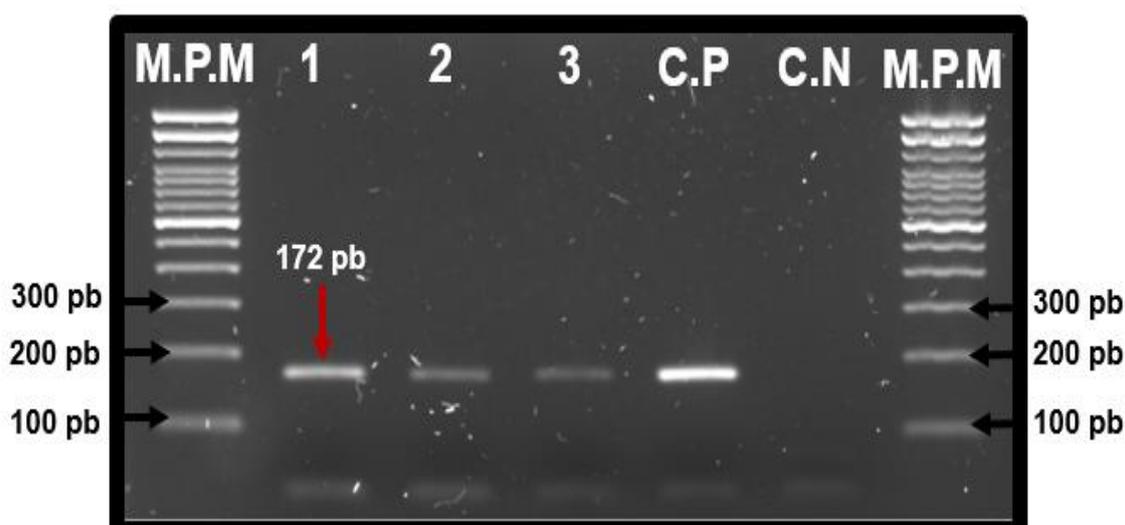


Figura 18. Amplicones de 172 bp visualizados por electroforesis y producidos en PCR simple estandarizada en un gel de agarosa al 2% teñido con SYBR<sup>®</sup> Safe, para identificación del subgénero *Viannia*.

Carril 1: Lesh\_001, Carril 2: Lesh\_002, Carril 3: Lesh\_003, Carril C.P: control positivo (Lesh\_014) para subgénero *Viannia*, Carril C.N: control negativo, y carriles M.P.M: marcador de peso molecular Invitrogen TrackIt<sup>®</sup> (100 bp a 2000 bp).

El análisis *a priori* generado para los cebadores ICPB demostró una temperatura de denaturación mínima de 53°C, lo que indicó que teóricamente, la temperatura de hibridación mínima debía ser de 48°C. Por teoría, la temperatura de

denaturación obtenida de los cebadores diseñados no se ajusta a los rangos óptimos de buen cebador ya que si su temperatura mínima de denaturación es muy baja generalmente pueden generarse hibridaciones inespecíficas (Dieffenbach, Lowe, y Dveksler, 1993). Por otro lado, los valores termodinámicos descritos en el acápite 5.1.2.1. también no se ajustaron a las características de un buen cebador ya que presentaron un alto grado de estabilidad termodinámica, lo que requiere de mucha energía para destruir los enlaces homodiméricos y heterodiméricos.

Sin embargo, empíricamente se determinó que la temperatura de hibridación óptima para dichos cebadores fue de 62°C, es decir, 14°C superior a la temperatura esperada de manera teórica. Adicionalmente, al darse la amplificación de los fragmentos también se pudo inferir que los enlaces homodiméricos y heterodiméricos también fueron destruidos. Esa variación en la temperatura de hibridación y en las condiciones fisicoquímicas de los cebadores pudo deberse a las diversas condiciones físicas en donde se desarrolló la reacción de PCR. Por una parte, la mezcla fue inducida a una temperatura inicial de 94°C durante 7 minutos (activación catalítica de la polimerasa *Hot Start*) lo que pudo generar cambios significativos y paralelos en las características termodinámicas de los cebadores, un estudio que sustenta dicho fenómeno es el de Lorenz (2012) en donde ha indicado que en una reacción *Hot Start* es normal que las temperaturas de hibridación de los cebadores superen a los 60°C ya que a mayor temperatura, la estabilidad de los enlaces en los oligonucleótidos será mucho menor (Mann, Humbert, Dorschner, Stamatoyannopoulos, y Noble, 2009). Por otra parte, otro factor a considerar, es el porcentaje de guaninas y citocinas de los ácidos nucleicos (cebadores y secuencias blanco) debido a que esto puede influir significativamente en el rendimiento de la polimerasa. La enzima *Hot Start Platinum*® Taq ADN polymerase tiene un rendimiento alto preferiblemente para secuencias con menor cantidad de guaninas y citocinas (ThermoScientific, 2015), en consecuencia, por parte de los cebadores, se calculó un porcentaje de 52,5% y por parte de la secuencia blanco se calculó un

porcentaje de 59,4%, lo que indica que el rendimiento de la reacción pudo desarrollarse en las condiciones esperadas.

### 5.2.2.2. Subgénero *Leishmania*

A su vez, las condiciones descritas en las Tablas 13 y 14 demostraron ser las mejores para la obtención de un fragmento de 300 pb (Figura 20) que permitió discriminar a este género por PCR simple.

Tabla 13.

*Condiciones de PCR simple optimizada en un termociclador Eppendorf para identificación del subgénero Leishmania*

Ciclos	Proceso en termociclador	Temperatura	Periodo
1	Activación enzimática	94 °C	7 minutos
40	Denaturación inicial	94 °C	30 segundos
	Hibridación "Cebador – ADN molde"	58 °C	30 segundos
	Elongación	72 °C	1 minuto
1	Elongación final	72 °C	7 minutos

Tabla 14.

*Concentraciones y volúmenes de reactivos de la PCR simple optimizada dirigida al subgénero Leishmania*

Componente de reacción	Concentración inicial	Concentración final	Volumen inicial (1Rx)
Buffer (-MgCl <sub>2</sub> )	10X	1X	1,0 µl
Platinum <sup>®</sup> Taq ADN polymerase	5 UI.µl <sup>-1</sup>	1,2 UI.µl <sup>-1</sup>	0,24 µl

dNTP Mix	10 mM	0,5 mM	0,5 µl
INAGA-F537	20 µM	0,5 µM	0,25 µl
INAGA-R836	20 µM	0,5 µM	0,25 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2,2 mM	0,44 µl
H <sub>2</sub> O	-	-	5,32 µl
ADN	-	10 ng µl <sup>-1</sup>	2,0 µl
Total	-	-	10 µl

En el análisis electroforético se demostró la efectiva amplificación parcial del gen *nagA* obteniendo un producto del tamaño aproximado de 300 pares de bases (pb) (Figura 13).

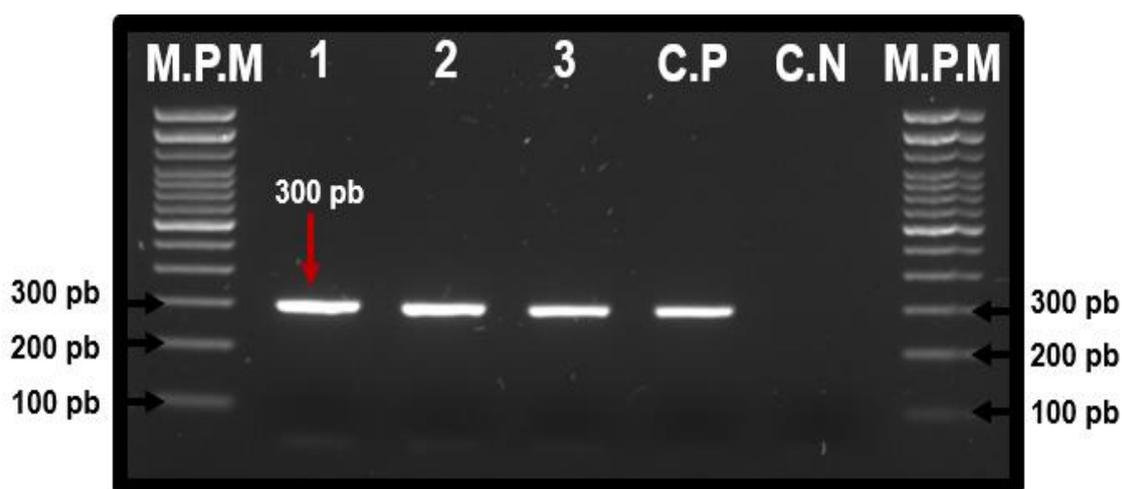


Figura 19. Amplicones de 172 bp visualizados por electroforesis y producidos en PCR simple estandarizada en un gel de agarosa al 2% teñido con SYBR® Safe, para identificación del subgénero *Leishmania*.

Carril 1: Cód. 99, Carril 2: Cód. 105, Carril 3: Cód. 157, Carril C.P: control positivo (Lesh\_016) para subgénero *Viannia*, Carril C.N: control negativo, y carriles M.P.M: marcador de peso molecular Invitrogen TrackIt® (100 bp a 2000 bp).

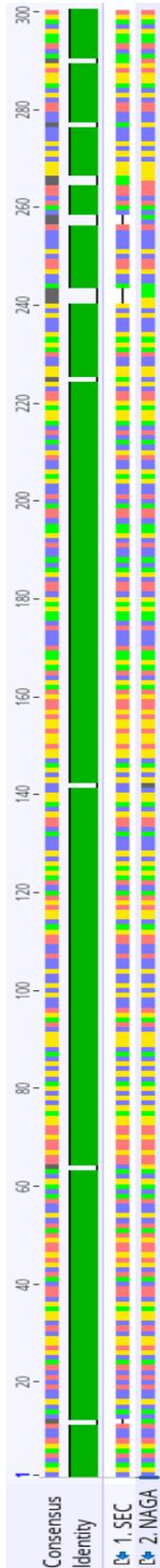
En comparación con la PCR simple para el subgénero *Viannia*, la temperatura de hibridación entre los cebadores y el ADN molde estuvo dentro de los rangos especificados por la literatura, los cuales deben oscilar con temperaturas de

denaturación entre 56°C y 62°C usando una enzima Taq polimerasa normal (Dieffenbach et al., 1993). Al igual que la anterior PCR, las características termodinámicas de los cebadores pudieron cambiar considerablemente debido a la inducción de temperaturas mayores que 90°C, obteniendo condiciones ideales para la amplificación (Mann et al., 2009). El porcentaje de guaninas y citocinas pertenecientes a la secuencia blanco no superaban el 60%, y los cebadores presentaron porcentajes menores al 58%, lo que indicó que las condiciones para el desarrollo de la reacción eran favorables.

### **5.2.3. Secuenciación de los controles positivos**

Los resultados de la secuenciación genómica se encuentran en los Anexos 4 y 5. Se determinó que las secuencias de los amplicones obtenidos a nivel experimental coinciden con los amplicones obtenidos a nivel bioinformático (Figuras 21 y 22) lo cual corroboró que estas muestras eran adecuadas para usarse como controles positivos en el ensayo.

De la misma manera, el programa bioinformático BLAST demostró que las secuencias obtenidas pertenecían a sus subgéneros correspondientes (ver Anexos 6 y 7).



Identities = 287/300 (95%),  
 Positives = 287/300 (95%), Gaps = 6/300 (2%)

```

SEC 1 CGTCATGACCA-CTGCCACACATCGAGGCACGGTGCACACTACGAGAAGATACGCCATCT 59
      CGTCATGACCA CTCGCCACACATCGAGGCACGGTGCACACTACGAGAAGATACGCCATCT
NAGA 1 CGTCATGACCATCTGCCACACACATCGAGGCACGGTGCACACTACGAGAAGATACGCCATCT 60

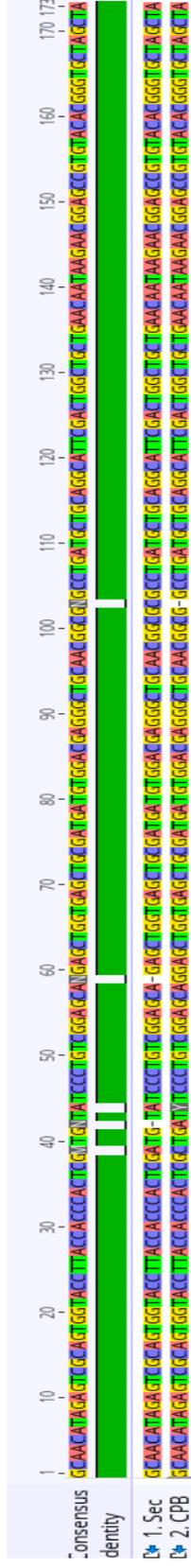
SEC 60 GCTCAAGAAGAAGGTGGCGTCTGGGTCATGACCGCGCCGCCACCAAGTCGGAGAT 119
      GCT AAGAAGAAGGTGGCGTCTGGGTCATGACCGCGCCGCCACCAAGTCGGAGAT
NAGA 61 GCTGAAGAAGAAGGTGGCGTCTGGGTCATGACCGCGCCGCCACCAAGTCGGAGAT 120

SEC 120 CATGTGCCCTCAAGTGGCCGCTGGAGGAGGAGAGATGCATGTTACCCACTTGTG 179
      CATGTGCCCTCAAGTGGC GCGTGGAGGAGGAGAGATGCATGTTACCCACTTGTG
NAGA 121 CATGTGCCCTCAAGTGGCRGCTGGAGGAGGAGAGATGCATGTTACCCACTTGTG 180

SEC 180 CAACGTCTCCACGTTCAATCACCGTGCCAGTCACTGGTGAACGTTGGCCATGTGCCCGCG 239
      CAACGTCTCCACGTTCAATCACCGTGCCAGTCACTGGTGAACG GGCATGTGCCCGCG
NAGA 181 CAACGTCTCCACGTTCAATCACCGTGCCAGTCACTGGTGAACGCGCCATGTGCCCGCG 240

SEC 240 ---TCCGAACGCCCCA--CTACAATTGGGGCGCCCTCCAACCGTGGAGTTCATTGTGA 294
      TCCGAACGCCCCA CTACAA GGGCGGCCCC CCAACGCTGGAG TCATTGTGA
NAGA 241 GTTTCGAACGCCCCACTCTACAAAGGGGGCGCCCGCCCAACCGCTGGAGATCATTGTGA 300
  
```

Figura 20. Alineamiento global por pares entre el producto de secuenciación del control positivo (Lesh\_016) con la secuencia consenso del gen *nagA* sin nucleótidos degenerados con el programa bioinformático Geneious (Kearse et al., 2012) mediante el uso del algoritmo Geneious en una matriz de similitud del 93% para la identificación del subgénero *Leishmania*.



Score = 796.0, Identities = 168/173 (97%),  
 Positives = 168/173 (97%), Gaps = 3/173 (1%)

```

Sec 1  GCAACATAGAGTCGCAGTGGTACCTTACCACCCACTCGATG-TATCCCTGTGGAGCA-G  58
      GCAACATAGAGTCGCAGTGGTACCTTACCACCCACTCG TG T TCCCTGTGGAGCA G
CPB 1  GCAACATAGAGTCGCAGTGGTACCTTACCACCCACTCGCTGATYTCCTGTGGAGCAGG  60

Sec 59 AGCTGGTGAGCTGGGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGCCTGATGCTGCAGGCA 118
      AGCTGGTGAGCTGGGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCG GCCTGATGCTGCAGGCA
CPB 61 AGCTGGTGAGCTGGGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCG-GCCTGATGCTGCAGGCA 119

Sec 119 TTCGACTGGCTGGTGAACAATAAGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTA 171
      TTCGACTGGCTGGTGAACAATAAGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTA
CPB 120 TTCGACTGGCTGGTGAACAATAAGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTA 172
  
```

Figura 21. Alineamiento global por pares entre el producto de secuenciación del control positivo (Lesh\_014) con la secuencia consenso del gen cpb sin nucleótidos degenerados con el programa bioinformático Geneious (Kearse et al., 2012) en una matriz de similitud del 93% mediante el uso del algoritmo Geneious para la identificación del subgénero Viannia.

Los resultados obtenidos en la secuenciación, respaldan que los marcadores *cpb* y el *nagA* son los más aptos para la generación de análisis molecular y filogenia de las especies del *Leishmania* (Akhoundi et al., 2016). Sin embargo, como se puede observar en las Figuras 16 y 17, el producto de PCR *in silico* contiene algunos nucleótidos degenerados. Para el alineamiento en el programa Geneious, se tuvo que generar una comparación entre la secuencia oficial y el amplicón secuenciado con el fin de determinar si el amplicón contenía los nucleótidos correctos con respecto a los nucleótidos degenerados de la secuencia oficial. Se debe recordar que la muestra amplificada pertenece únicamente a una especie y la secuencia oficial es un consenso entre todas las especies de un subgénero. En dicha comparación todos los nucleótidos coincidieron con el grupo de los nucleótidos degenerados de la secuencia oficial.

#### **5.2.4. Estandarización de PCR múltiple para identificación de subgéneros *Leishmania* y *Viannia*.**

Las temperaturas óptimas en el termociclador para la PCR múltiple se encuentran especificadas en la Tabla 15, como resultado, la temperatura de hibridación óptima de los cebadores a la cadena molde fue de 64°C. A comparación de las PCR simples estandarizadas por separado, las concentraciones de deoxinucleótidos trifosfato, cebadores y polimerasa fueron modificadas (Tabla 16). En el caso de los deoxinucleótidos trifosfato, se aumentó una concentración final de 0,7 mM. Para los cebadores ICPB se aumentó a una concentración de 0,7µM y se mantuvo la concentración de 0,5 µM para el par de cebadores INAGA. Por otro lado, para la enzima polimerasa, se decidió cambiar a una concentración final de 1,5 UI. µl<sup>-1</sup>.

Tabla 15.

*Condiciones de PCR múltiple optimizada en un termociclador Eppendorf para identificación de los subgéneros Leishmania y Viannia*

Ciclos	Proceso en termociclador	Temperatura (°C)	Periodo
1	Activación enzimática	94 °C	7 minutos
40	Denaturación inicial	94 °C	30 segundos
	Hibridación "Cebador – ADN molde"	64 °C	30 segundos
	Elongación	72 °C	1 minuto
1	Elongación final	72 °C	7 minutos

Tabla 16.

*Concentraciones y volúmenes de reactivos de la PCR múltiple optimizada dirigida a la discriminación de los subgéneros Leishmania y Viannia*

Componente de reacción	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final (1Rx)
Buffer (-MgCl <sub>2</sub> )	10X	1X	1,0 µl
Platinum <sup>®</sup> Taq ADN polymerase	5 UI.µl <sup>-1</sup>	1,5 UI µl <sup>-1</sup>	0,3 µl
dNTP Mix	10 mM	0,7 Mm	0,7 µl
INAGA-F537	20 µM	0,5 µM	0,25 µl
INAGA-R836	20 µM	0,5 µM	0,25 µl
ICPB-F470	20 µM	0,7 µM	0,35 µl
ICPB-R641	20 µM	0,7 µM	0,35 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2,5 mM	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	-	-	4,3 µl
ADN	-	10 ng µl <sup>-1</sup>	2,0 µl
Total	-	-	10 µl

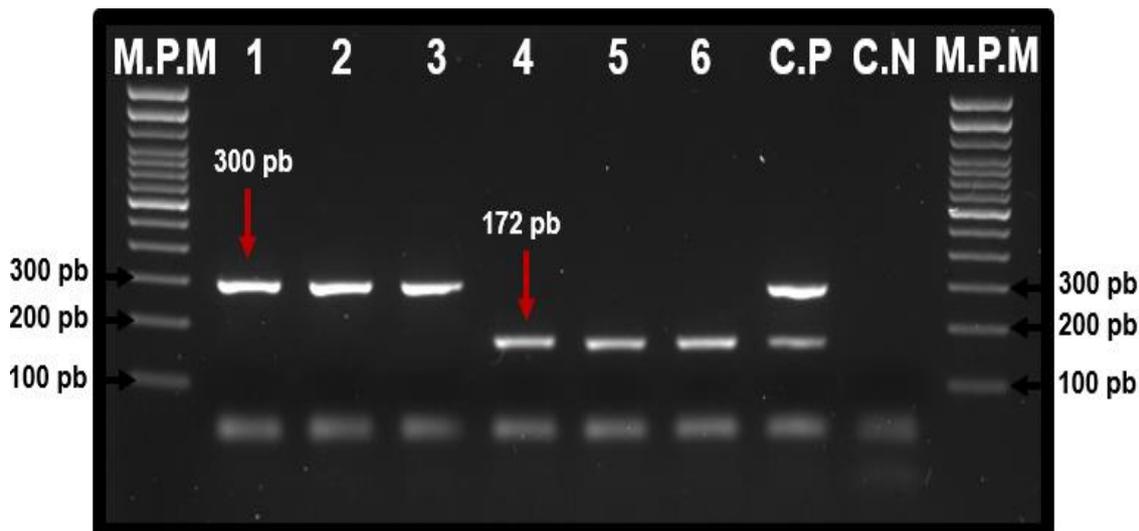


Figura 22. Amplicones de 172 bp y 300 pb visualizados por electroforesis y producidos en PCR múltiple estandarizada en un gel de agarosa al 2% teñido con SYBR® Safe, para identificación de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*.

Carril 1: Lesh\_001, Carril 2: Lesh\_002, Carril 3: Lesh\_003, Carril 1: Cód. 99, Carril 2: Cód. 105, Carril 3: Cód. 157, Carril C.P: Control Positivo (Coinfección artificial), Carril C.N: Control Negativo, Carril M.P.M: Marcador de peso molecular Invitrogen TrackIt® (100 bp a 2000 bp).

La implementación de las dos primeras PCR simples proporcionaron un panorama general de las condiciones necesarias para la amplificación parcial de los dos genes blanco.

Sin embargo, las condiciones de una PCR múltiple pueden ser muy distintas ya sea desde la temperatura de hibridación hasta las concentraciones de los reactivos. En el caso la temperatura de hibridación, esta fue mayor a comparación con las temperaturas de hibridación de las reacciones convencionales por separado siendo de 64°C, esto se pudo deber a dos puntos importantes: el primer punto se basa en que la amplificación múltiple va dirigida a 2 locus de distintas localizaciones cromosómicas, es por ello, que se requiere mayor exactitud en la hibridación de los oligonucleótidos a sus moldes. En consecuencia, se sabe que a mayor temperatura, la hibridación en la PCR será más específica y a menor temperatura, habrá amplificaciones inespecíficas

(Henegariu et al., 1997). Otro punto es el tipo de enzima usada en la reacción, como ya se mencionó anteriormente, es normal que en una reacción *Hot Start*, las temperaturas de hibridación superen a los 60°C (Lorenz, 2012).

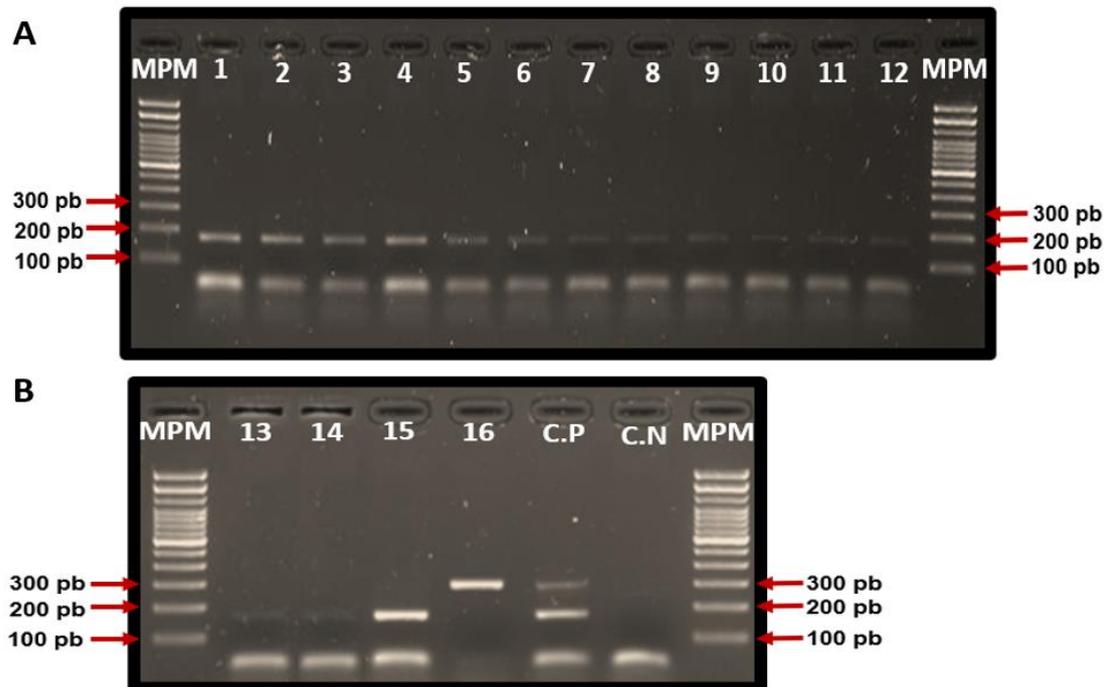
Por otro lado, la modificación en las concentraciones de los cebadores fue requerida, debido a que en las pruebas iniciales de PCR con concentraciones equimolares mostraron una mayor amplificación en el gen *nagA* con respecto al gen *cpb*. Dichos resultados se pudieron deber al nivel de eficiencia de cada par de cebadores. En consecuencia, los cebadores en la reacción de PCR pudieron generar una competencia en donde pudo ser influenciada por: sus características termodinámicas, el porcentaje de guaninas – citocinas y la especificidad nucleotídica (Panayotis Markoulatos et al., 1999; Sint, Raso, y Traugott, 2012). Un punto que puede sustentar el fenómeno producido, es la cantidad de *mismatches* nucleotídicos (especificidad) que pueden tener los cebadores con respecto a la cadena molde. En el caso de los cebadores *cpb forward* y *reverse*, contienen hasta 1 nucleótido degenerado por secuencia, es decir que, globalmente por cada par de cebadores en la mezcla existen 2 nucleótidos degenerados lo que puede disminuir la probabilidad de hibridación en el caso de una muestra que contiene una sola especie de un subgénero. A diferencia del par *ICPB*, el par de cebadores dirigidos para el gen *nagA*, tuvieron una mayor probabilidad de hibridarse con su cadena molde respectiva, ya que estos contienen un solo nucleótido degenerado. Por lo tanto, el aumento de concentración por parte de los cebadores degenerados era necesario para aumentar la probabilidad de hibridación entre los nucleótidos correctos. La concentración enzimática también varió en el presente experimento, esto pudo deberse al aumento de la concentración de los cebadores conjuntamente a las distintas localidades cromosómicas en donde estos deben hibridarse, al aumentar la concentración de enzima, se tuvo que aumentar la concentración de dNTP y cloruro de magnesio por igual ya que si existe una elevada concentración de nucleótidos, estos pueden inhibir la PCR ya que pueden unirse al magnesio disponible presente en la polimerasa (Henegariu et al., 1997; Markoulatos, Siafakas, y Moncany, 2002).

## **5.2.5. Aplicación de PCR múltiple para la detección de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* en muestras de pacientes**

### **5.2.5.1. Validación de la técnica estandarizada**

Los resultados de la amplificación por PCR múltiple de los marcadores moleculares *cpb* y *nagA* usados para demostrar la presencia o ausencia de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* tanto de las 16 muestras usadas como controles positivos, así como de las ciento veinticinco muestras proporcionadas por el Dr. Jacob Bezemer se muestran en las Figuras 23, 24, 25, 26, 27.1 y 27.2 y en las Tablas 17 y 18.

Las dieciséis muestras usadas para la estandarización mostraron un diagnóstico positivo de presencia de *Leishmania* para microscopía y PCR gracias a la identificación de las bandas positivas de 172 pb y 300 pb que se observan en la Figura 23 demostrando una alta reproducibilidad de la técnica diseñada, es importante recalcar que las muestras Lesh\_009, Lesh\_010, Lesh\_011 y Lesh\_012 presentaron bandas sutiles como se aprecia en la Figura antes citada.



*Figura 23.* Amplicones visualizados por electroforesis y producidos en la aplicación de la PCR múltiple estandarizada en un gel de agarosa de dos pisos al 2% teñido con SYBR® Safe, para identificación de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*.

A. Primer piso: Carril 1: Lesh\_001, Carril 2: Lesh\_002, Carril 3: Lesh\_003, Carril 4: Lesh\_004, Carril 5: Lesh\_005, Carril 6: Lesh\_006, Carril 7: Lesh\_007, Carril 8: Lesh\_008, Carril 9: Lesh\_009, Carril 10: Lesh\_010, Carril 11: Lesh\_011, Carril 12: Lesh\_012. B. Segundo piso: Carril 13: Lesh\_013, Carril 14: Lesh\_014, Carril 15: Lesh\_015, Carril 16: Lesh\_016, Carril C.P: Control positivo (Coinfección Artificial), Carril C.N: Control negativo, Carriles M.P.M: marcador de peso molecular Invitrogen TrackIt® (100 bp a 2000 bp).

Estos resultados, pudieron deberse a que la concentración de ADN de las muestras empleadas, si bien poseían un mismo valor, la integridad de las mismas se pudo ver comprometida ya que estuvieron almacenadas durante un periodo de dos años cubiertas con papel a temperatura ambiente, lo que pudo desarrollar condiciones óptimas para el desarrollo de agentes contaminantes externos como hongos y bacterias ambientales, generando así muestras en pésimo estado de conservación. Entre los agentes que más típicos que pueden presentarse en muestras sanguíneas extraídas de ese tipo pueden ser:

*Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* *Pseudomonas aeruginosa* y *Aspergillus* (Brecher y Hay, 2005). En consecuencia, la presencia de dichos agentes contaminantes presentes en una muestra, pueden producir enzimas extracelulares como proteasas, deoxiribonucleasas y exonucleasas que pudieron dañar la integridad de las células hospederas inmovilizadas en el portaobjetos conjunto a los parásitos presentes intracelularmente (Rodríguez et al., 1994).

#### **5.2.5.2. Comparación de los resultados obtenidos entre microscopía y PCR múltiple**

De las ciento veinticinco muestras procesadas por PCR múltiple, treinta y dos fueron detectadas con presencia *Leishmania* (Figuras 25, 26, 27 y 28) y noventa y tres fueron diagnosticadas con ausencia del agente etiológico.

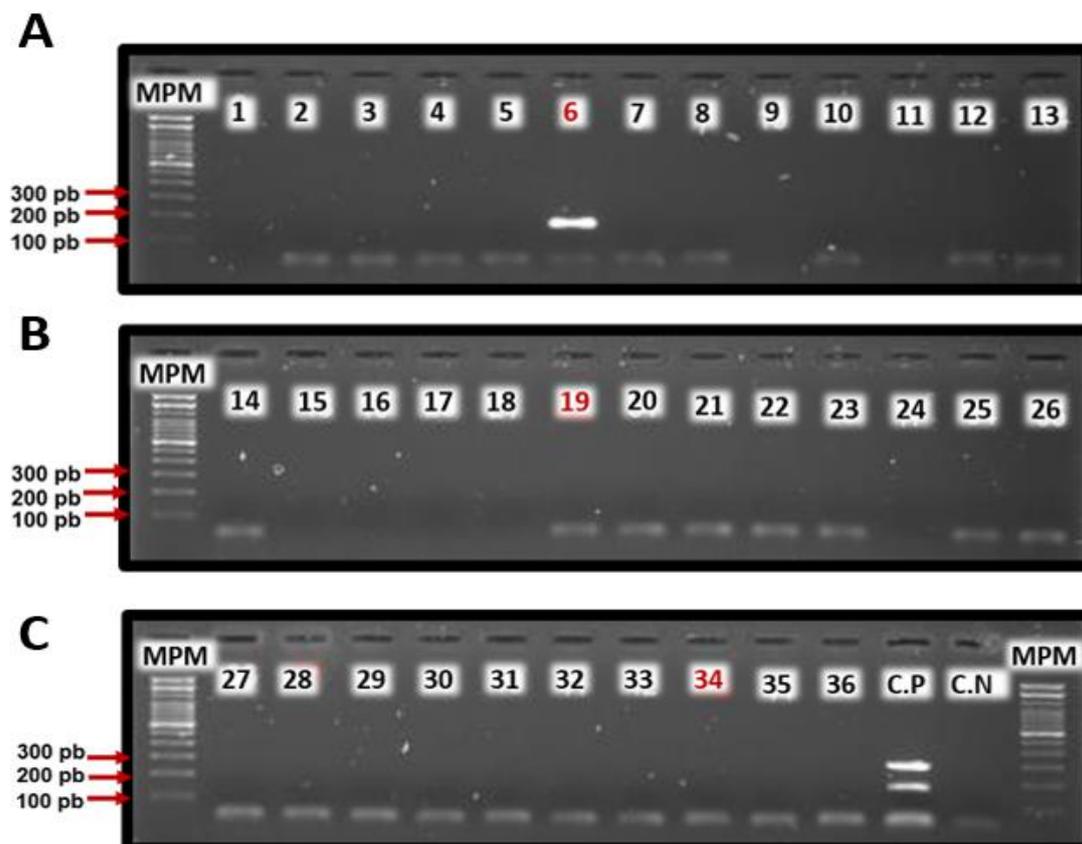


Figura 24. Amplicones visualizados por electroforesis y producidos en la aplicación de la PCR múltiple estandarizada en un gel de agarosa de tres pisos al 2% teñido con SYBR® Safe en muestras de pacientes sospechosos portadores de *Leishmania*.

A. Primer piso: Carril 1: Cód. 0, Carril 2: Cód. 1, Carril 3: Cód. 2, Carril 4: Cód. 3, Carril 5: Cód. 4, Carril 6: Cód. 5, Carril 7: Cód. 6, Carril 8: Cód. 7, Carril 9: Cód. 10, Carril 10: Cód. 11, Carril 12: Cód. 10, Carril 12: Cód. 13, Carril 13: Cód. 14. B. Segundo piso: Carril 14: Cód. 15, Carril 15: Cód. 18, Carril 16: Cód. 19, Carril 17: Cód. 20, Carril 18: Cód. 21, Carril 19: Cód. 22, Carril 20: Cód. 31, Carril 21: Cód. 32, Carril 22: Cód. 33, Carril 23: Cód. 16, Carril 24: Cód. 17, Carril 25: Cód. 34, Carril 26: Cód. 35. C. Tercer piso: Carril 27: Cód. 36, Carril 28: Cód. 37, Carril 29: Cód. 38, Carril 30: Cód. 39, Carril 31: Cód. 40, Carril 32: Cód. 41, Carril 33: Cód. 42, Carril 34: Cód. 43, Carril 35: Cód. 44, Carril 36: Cód. 45, Carril C.P: Control positivo (Coinfección Artificial), Carril C.N: Control negativo, Carril M.P.M: marcador de peso molecular Invitrogen TrackIt® (100 pb a 2000 bp).

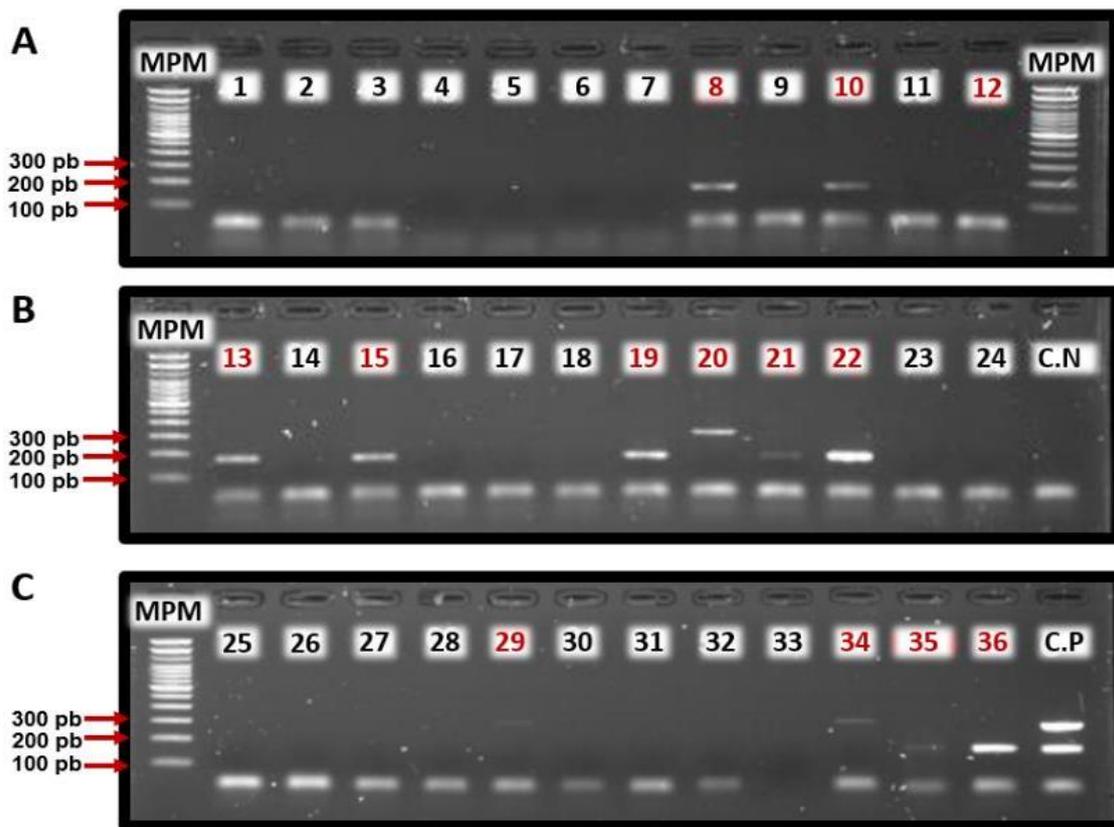
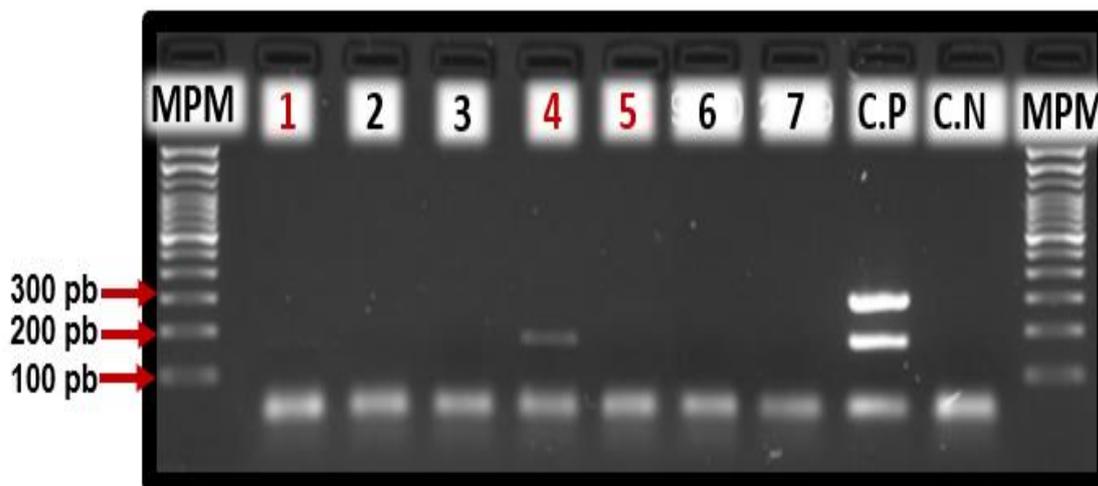


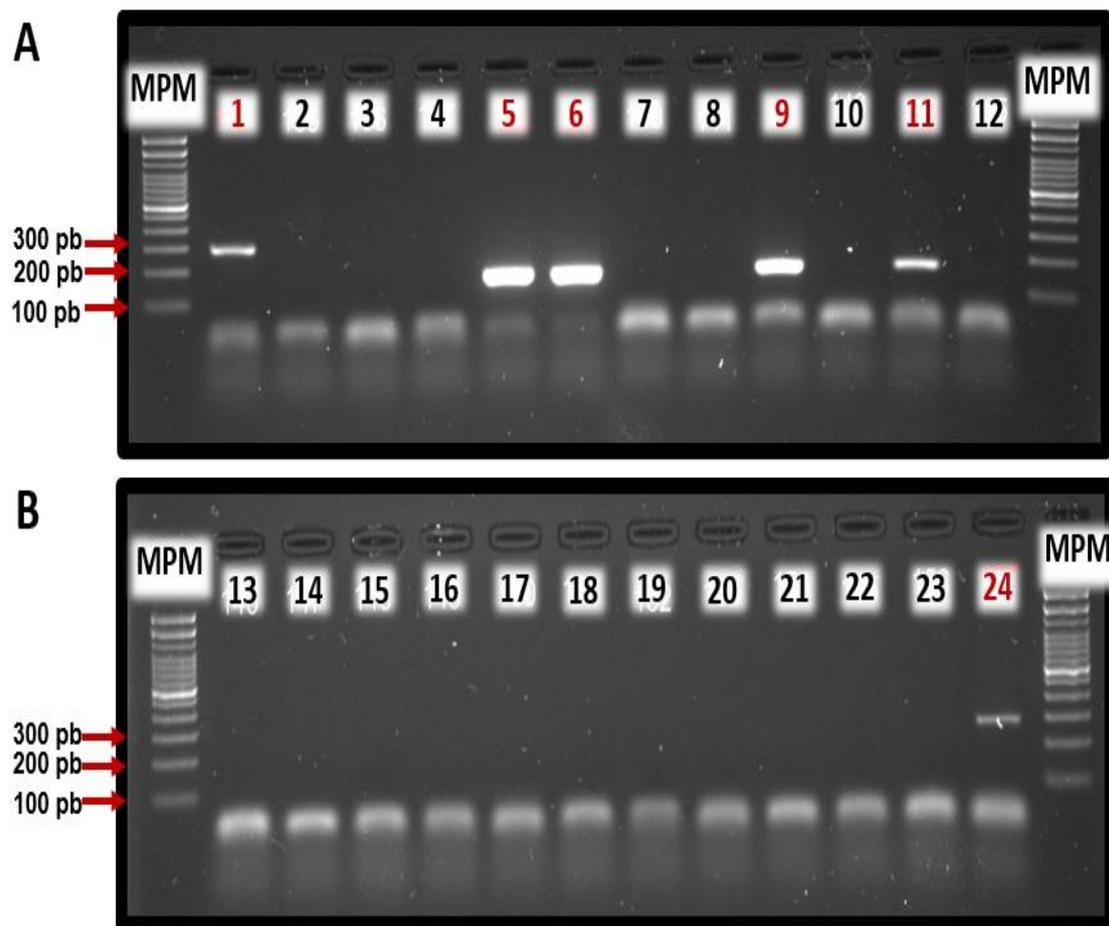
Figura 25. Amplicones visualizados por electroforesis y producidos en la aplicación de la PCR múltiple estandarizada en un gel de agarosa de tres pisos al 2% teñido con SYBR® Safe en muestras de pacientes sospechosos portadores de *Leishmania*.

A. Primer piso: Carril 1: Cód. 46, Carril 2: Cód. 47, Carril 3: Cód. 48, Carril 4: Cód. 49, Carril 5: Cód. 50, Carril 6: Cód. 51, Carril 7: Cód. 52, Carril 8: Cód. 53, Carril 9: Cód. 54, Carril 10: Cód. 55, Carril 11: Cód. 56, Carril 12: Cód. 85. B. Segundo piso: Carril 13: Cód. 84, Carril 14: Cód. 83, Carril 15: Cód. 82, Carril 16: Cód. 81, Carril 17: Cód. 80, Carril 18: Cód. 79, Carril 19: Cód. 78, Carril 20: Cód. 77, Carril 21: Cód. 76, Carril 22: Cód. 75, Carril 23: Cód. 74, Carril 24: Cód. 73. C. Tercer Piso: Carril 25: Cód. 72, Carril 26: Cód. 71, Carril 27: Cód. 70, Carril 28: Cód. 63, Carril 29: Cód. 62, Carril 30: Cód. 61, Carril 31: Cód. 60, Carril 32: Cód. 59, Carril 33: Cód. 58, Carril 34: Cód. 57, Carril 35: Cód. 9026, Carril C.P; Control positivo (Coinfección Artificial), Carril C.N: Control negativo, Carril M.P.M: marcador de peso molecular Invitrogen TrackIt® (100 bp a 2000 bp).



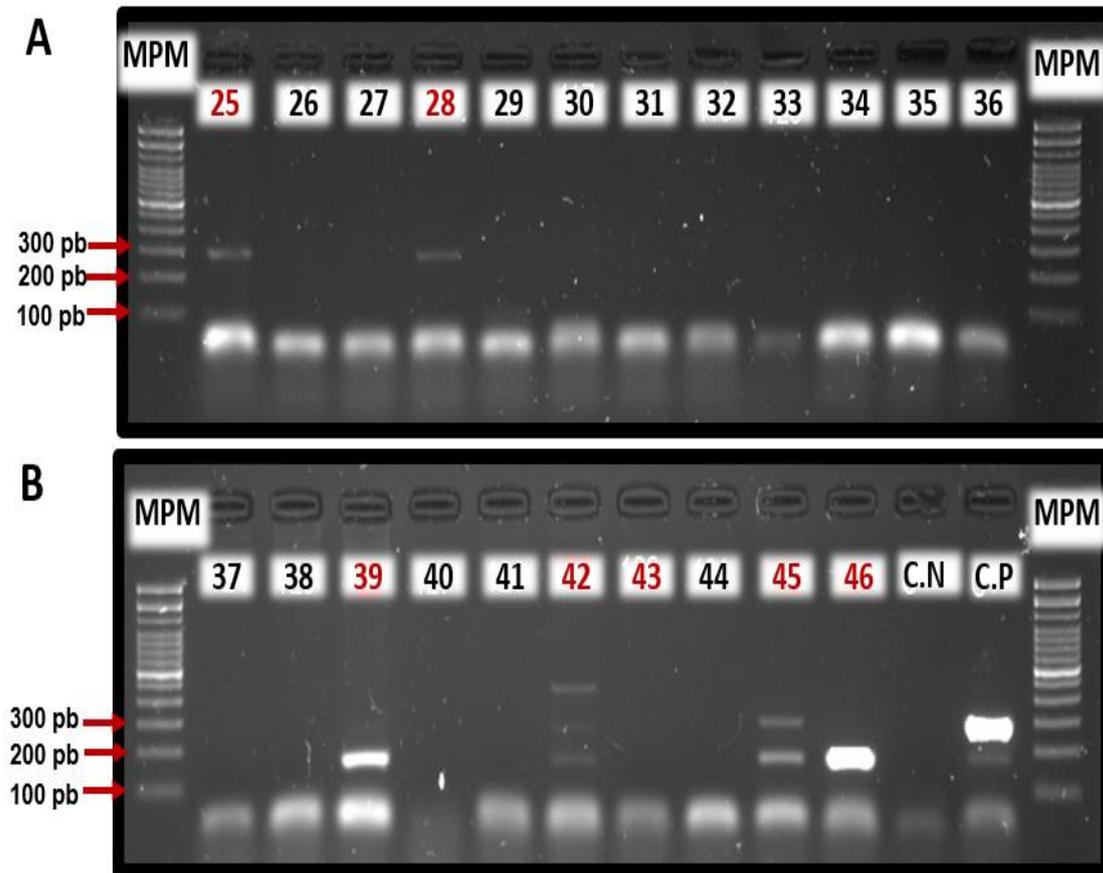
*Figura 26.* Amplicones visualizados por electroforesis y producidos en la aplicación de la PCR múltiple estandarizada en un gel de agarosa de un piso al 2% teñido con SYBR® Safe en muestras de pacientes sospechosos portadores de *Leishmania*.

Carril: Cód. 87, Carril 2: Cód. 88, Carril 3: Cód. 89, Carril 4: Cód. 90, Carril 5: Cód. 95, Carril 6: Cód. 9320, Carril 7: Cód. 2989, Carril C.P: Control positivo (Coinfección Artificial), Carril C.N: Control negativo, Carril M.P.M: marcador de peso molecular Invitrogen TrackIt® (100 bp a 2000 bp).



*Figura 27.1.* Amplicones visualizados por electroforesis y producidos en la aplicación de la PCR múltiple estandarizada en un gel de agarosa de cuatro pisos al 2% teñido con SYBR® Safe en muestras de pacientes sospechosos portadores de *Leishmania*.

A. Primer piso: Carril 1: Cód. 134, Carril 2: Cód. 135, Carril 3: Cód. 136, Carril 4: Cód. 137, Carril 5: Cód. 138, Carril 6: Cód. 139, Carril 7: Cód. 140, Carril 8: Cód. 141, Carril 9: Cód. 142, Carril 10: Cód. 143, Carril 11: Cód. 144, Carril 12: Cód. 145. B. Segundo piso: Carril 13: Cód. 146, Carril 14: Cód. 147, Carril 15: Cód. 148, Carril 16: Cód. 149, Carril 17: Cód. 150, Carril 18: Cód. 151, Carril 19: Cód. 152, Carril 20: Cód. 153, Carril 21: Cód. 154, Carril 22: Cód. 155, Carril 23: Cód. 156, Carril 24: Cód. 157. Carril M.P.M: marcador de peso molecular Invitrogen TrackIt® (100 bp a 2000 bp).



*Figura 27.2.* Amplicones visualizados por electroforesis y producidos en la aplicación de la PCR múltiple estandarizada en un gel de agarosa de cuatro pisos al 2% teñido con SYBR® Safe en muestras de pacientes sospechosos portadores de *Leishmania*.

A. Tercer Piso: Carril 25: Cód. 99, Carril 26: Cód. 102, Carril 27: Cód. 104, Carril 28: Cód. 105, Carril 29: Cód. 106, Carril 30: Cód. 117, Carril 31: Cód. 118, Carril 32: Cód. 119, Carril 33: Cód. 120, Carril 34: Cód. 121, Carril 35: Cód. 122, Carril 36: Cód. 123. B. Cuarto piso: Carril 37: Cód. 124, Carril 38: Cód. 125, Carril 39: Cód. 126, Carril 40: Cód. 127, Carril 41: Cód. 128, Carril 42: Cód. 129, Carril 43: Cód. 130, Carril 44: Cód. 131; Carril 45: Cód. 132: Carril 46: Cód. 133, Carril C.P: Control positivo (Coinfección Artificial), Carril C.N: Control negativo, Carril M.P.M: marcador de peso molecular Invitrogen TrackIt® (100 bp a 2000 bp).

La comparación de sensibilidad de PCR con respecto a la microscopía se encuentra detallada en la Tabla 17 a continuación.

Tabla 17.

*Comparación entre técnicas usadas para la detección de la presencia de Leishmania en muestras de pacientes (Microscopía vs PCR múltiple).*

Resultado PCR	Resultado Microscopía	Número de casos (n)	Porcentaje de casos (%)
Positivo	Positivo	19	13
Negativo	Negativo	90	63,83
Positivo	Negativo	29	21
Negativo	Positivo	3	2,13
Total		141	100

Al comparar los resultados obtenidos entre la microscopía clásica y la PCR múltiple, se pudo observar que las dos técnicas coincidieron con el diagnóstico de ciento nueve muestras (77,30%), de las cuales diecinueve fueron diagnosticadas con presencia de *Leishmania* (13,47%) y noventa (63,83%) fueron diagnosticadas con ausencia del agente etiológico.

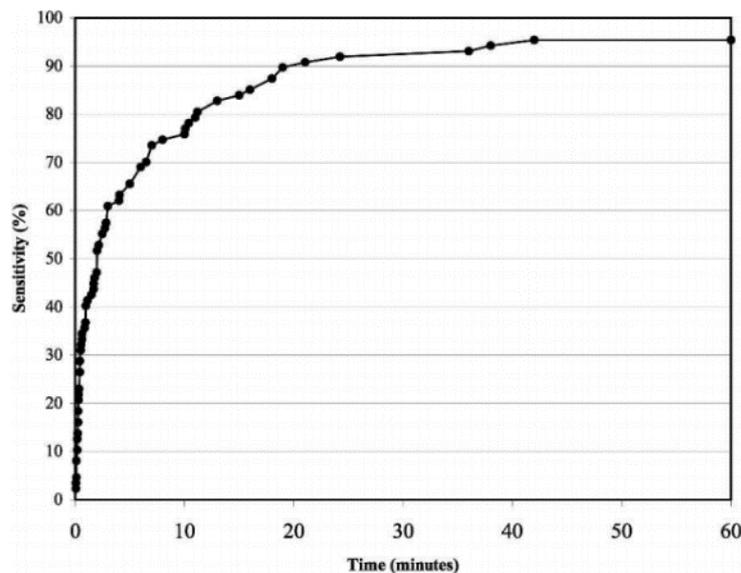
Sin embargo, hubo una discrepancia de resultados entre las dos técnicas. Por un lado, la técnica de microscopía determinó la ausencia del agente etiológico en veinte nueve muestras (20,57%), de las cuales todas mostraron ser positivas mediante PCR; por el otro lado, la técnica de PCR mostró la ausencia del agente etiológico en tres muestras (2,13%) a pesar de que el análisis por microscopía mostró la presencia del mismo. Generando así resultados ambiguos en la detección global del parásito en las muestras de estudio.

Mediante un análisis descriptivo, se determinó que los niveles de sensibilidad de la PCR con respecto a la microscopía fueron relativamente altos con un porcentaje global de 86,4% y los niveles de especificidad de la prueba molecular fueron de un 75,6%. Diversos estudios han demostrado la diferencia entre la especificidad y la sensibilidad entre las técnicas de PCR y microscopía, de las

cuales la mayoría han demostrado que la PCR es la herramienta más prometedora para la identificación de los agentes etiológicos (Coleman et al., 2006; Bensoussan, Nasereddin, Jonas, Schnur, y Jaffe, 2006; El-Salam et al., 2014; Osman et al., 1997).

En el caso de la sensibilidad, varios estudios han determinado que la PCR puede tener porcentajes de sensibilidad altos desde el 80% hasta el 96% de las muestras examinadas, concordando con los resultados obtenidos en el presente proyecto. Sin embargo, existen estudios que afirman que la microscopía también tiene niveles de sensibilidad altos que pueden llegar hasta el 95% lo que puede generar también discrepancias a comparación de la PCR, ya que en los otros estudios no tomaron en cuenta dos factores imprescindibles que pueden influenciar positivamente a la sensibilidad microscópica: La experticia humana y el tiempo de análisis (Da Silva, Stewart, y Costa, 2005). En el caso de la experticia humana los resultados dependen únicamente de la experiencia de la persona encargada. Si el microscopista del estudio fue de un nivel de experticia alto, los niveles de sensibilidad pueden aumentar por parte de la microscopía. Además, para la determinación de un diagnóstico clínico considerable por leishmaniasis, necesariamente se requiere del análisis por duplicado e inclusive por triplicado de la misma muestra por parte de diferentes microscopistas de varios laboratorios (Brustoloni et al., 2007). Dicho factor, pudo afectar considerablemente a la sensibilidad de la PCR estandarizada ya que las 141 muestras fueron analizadas *a priori* con microscopistas de un alto nivel de experticia lo que pudo ser un punto en contra para que la PCR disminuyese su eficacia. Por otro lado, el tiempo es otro factor influyente en la microscopía, ya que, si se fusiona un microscopista de alto nivel de experticia con un periodo largo de análisis, la probabilidad de identificación de un agente etiológico puede ser hasta el 95%. Varios estudios han demostrado que para la obtención de una sensibilidad del 95% en microscopía se requiere por lo menos de un periodo de análisis de entre 40 y 60 minutos por muestra (Figura 28). Sin embargo, para el presente proyecto, se sabe que el tiempo promedio usado por los microscopistas para el análisis de las muestras pudo ser de 10 a 15 minutos lo que pudo generar

una disminución considerable de la sensibilidad a porcentajes menores al 80%. Sin embargo, la sensibilidad de la PCR fue de 86,4%, lo que indicó que la PCR fue levemente sensible, pero no mostró un valor alto que pudiese concordar con los altos porcentajes reportados por otros estudios. Lo que pudo demostrar que los microscopistas que analizaron las muestras de estudio eran de alto nivel de experticia.



*Figura 28.* Determinación de la sensibilidad de la microscopía con respecto al tiempo de análisis por muestra de paciente infectado.

Tomado de (Da Silva et al., 2005)

Por el lado de la especificidad para la detección de pacientes con ausencia del agente etiológico, la microscopía ha demostrado resultados coincidiendo con la PCR en 63,83% del total de las muestras, lo que pudo significar que el nivel de eficacia de las dos técnicas estaban casi mismo nivel, para la eficacia, también se debe tomar en cuenta los parámetros nombrados anteriormente, sin embargo, a pesar de que muchos estudios demostraron la efectividad de la PCR en el área de la sensibilidad, también obtuvieron resultados bajos en donde la microscopía obtuvo un alto porcentaje de especificidad con respecto a la detección de pacientes con ausencia del agente etiológico, lo que pudo significar que para

identificación de individuos sanos, fue mejor la aplicación de un diagnóstico por microscopía (El-Salam et al., 2014).

A pesar de que la microscopía puede ofrecer varias ventajas en la sensibilidad y especificidad (siempre y cuando tenga un personal capacitado con una amplitud considerable de tiempo de análisis por muestra), esta no tiene la capacidad de diferenciar a los agentes etiológicos a nivel taxonómico ya que estos tienen altos niveles de similitud morfológica. Por lo tanto, la microscopía puede ser usada únicamente para detectar de manera muy generalizada la presencia o ausencia del parásito. A diferencia de la PCR, en donde puede detectar y diferenciar a los agentes etiológicos, permitiendo la visualización de un panorama de los posibles cuadros clínicos que pueden desarrollarse ya que los subgéneros y las especies son influyentes para el desarrollo de distintos cuadros clínicos (Akhoundi et al., 2017).

Por otro lado, la ambigüedad entre los resultados que mostraron ser positivos para la presencia del agente etiológico por microscopía con respecto a los resultados negativos obtenidos por PCR múltiple pudo deberse a distintos factores de índole molecular y técnica. Entre los aspectos de índole molecular, se sabe que existen diversos agentes inhibidores de la PCR que pueden estar presentes en muestras de tejido linfático. Para la extracción de dicho tejido, es importante generar una pequeña biopsia a nivel cutáneo, en consecuencia, en dicho procedimiento varios agentes como sustancias antivirales, hemoglobina, heparina, hormonas, anticuerpos y mioglobina pudieron haberse agregado involuntariamente junto a las células de estudio (macrófagos) y pudieron haber afectado en el procesamiento posterior para la extracción de ADN y su amplificación por PCR (Schrader, Schielke, Ellerbroek, y Johne, 2012).

Otros estudios determinaron que la presencia de inmunoglobulina G puede inhibir a la PCR, debido a que este anticuerpo es muy propenso a la interacción con respecto a cadenas de ADN monocatenario (Sidstedt et al., 2018). Por lo

consiguiente, el presente estudio al usar ADN monocatenario por medio de la extracción con Chelex, pudo ser propenso a la inhibición por parte de inmunoglobulinas presentes en las muestras de estudio.

Otro punto a considerar para la justificación del apareamiento de un posible error por parte de la PCR, fue la toma y el procesamiento posterior de la muestra. Uno de los limitantes para el desarrollo del presente estudio, fue la carencia de información acerca de la parasitemia del paciente. Ya que, si un paciente presentó niveles de parasitemia relativamente bajos y hubo un error considerable en el muestreo, el procesamiento molecular pudo haber generado errores contundentes. Cabe mencionar que la presencia de amastigotes en los macrófagos del tejido linfático no es uniforme, en consecuencia, la toma inicial de la muestra requiere de un alto nivel de experticia. Es decir, que, si la persona que muestrea genera una mala recolección de la biopsia, y de manera involuntaria acarrió únicamente a células sanas, el impacto del diagnóstico afectaría de manera negativa significativamente (Brustoloni et al., 2007).

#### **5.2.5.3. Prevalencia de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania* de las provincias de Pastaza y Napo**

El análisis de prevalencia de los subgéneros de estudio se encuentra especificada en la Tabla 18. En donde se pudo observar un alto índice de prevalencia del subgénero *Viannia* en las dos provincias estudiadas. De las 138 muestras analizadas, 38 (25,36%) demostraron ser del subgénero *Viannia*. Diversos estudios realizados en el Ecuador, han demostrado que en la Amazonía hay la prevalencia de especies del subgénero *Viannia* como *L. braziliensis*, *L. lainsoni*, y *L. naiffi*, demostrando así el mayor porcentaje mostrado por el subgénero *Viannia*.

El Ministerio de Salud Pública (MSP), en la gaceta epidemiológica en donde se recolectó los datos del último brote de leishmaniasis en el año 2017, demostró

que la provincia del Napo tuvo 95 (0,092%) casos confirmados de leishmaniasis y que la provincia de Pastaza tuvo hasta 199 (0,24%) casos. El 100% de los casos analizados mostraron la presencia del cuadro clínico cutáneo. En este estudio, la cantidad de muestras procesadas no fueron las suficientes para hacer un análisis epidemiológico de prevalencia de subgéneros contundente debido a que no se tuvieron los siguientes datos: a) Los sitios de muestreo, b) El tamaño real de la población estudiada, c) Los índices de parasitemia de cada paciente afectado y d) La distribución geográfica de los vectores y los posibles hospederos intermediarios (Silvestres y domésticos) (Calvopina et al., 2006; Calvopiña et al., 2004; Dantas-Torres, 2007; Granda, 2017; Kato et al., 2016; Souza et al., 2009).

Tabla 18.

*Análisis de prevalencia de subgéneros de Leishmania (Viannia y Leishmania) en las provincias del Napo y Pastaza de muestras positivas por PCR. Se excluyeron muestras que mostraron ser positivas para microscopía y negativas por PCR.*

Resultado	Provincia	Casos por provincia (n)	Porcentaje (%)	Casos totales	Porcentaje acumulativo
Viannia positivo	Napo	27	19.57	35	25.36
	Pastaza	8	5.80		
Leishmania positivo	Napo	10	7.25	11	7.97
	Pastaza	1	0.72		
Viannia y Leishmania positivo (Coinfección)	Napo	2	1.45	2	1.45
	Pastaza	0	0.00		
Negativos	Napo	90	65.22	90	65.22
	Pastaza	0	0.00		
Total		138	100.00	138	100.00

Por último, pero no menos importante del presente estudio, fue la aplicación del método desarrollado en el diagnóstico de muestras provenientes de enfermos sospechosos de presentar leishmaniasis cutánea. Cabe mencionar que no se aplicaron las 16 primeras muestras debido a que no se sabía el género de los pacientes. Por otro lado, de un total de 125 muestras sospechosas impregnadas en papel filtro y desde donde se extrajo el ADN, se obtuvo 32 muestras positivas con bandas para el género *Leishmania*. De estas muestras, 20 (62,5%) mostraron una banda de 172 bp pertenecientes al subgénero *Viannia*, 10

(31,25%) muestras mostraron bandas de 300 bp características del subgénero *Leishmania* y 2 (6,25%) muestras presentaron coinfección de los dos subgéneros de estudio. En base a dichos resultados se pudo determinar que el 62,5% de pacientes infectados tuvieron la probabilidad de presentar los cuadros clínicos mucocutáneo y cutáneo. A diferencia del 31,25% que tuvieron la probabilidad de tener el cuadro clínico cutáneo y no visceral, ya que no hay especies como *L. infantum*, *L. donovani* y *L. major* en la Amazonía ecuatoriana (Armijos et al., 1990; Calvopiña et al., 2006; Calvopiña et al., 2004; Kato et al., 2016; Kato et al., 2013). Otro punto importante a recalcar en el presente estudio, fue la identificación de dos pacientes que tuvieron coinfecciones de especies pertenecientes a los dos subgéneros (*Viannia* y *Leishmania*) en donde presentaron el cuadro clínico mucocutáneo. Esto pudo deberse a que la especie del subgénero *Viannia* del paciente fue la dominante y pudo inhibir el desarrollo de la otra perteneciente al otro subgénero, en consecuencia el cuadro mucocutáneo fue prevalente para la persona afectada. Diversos estudios soportan dicha afirmación, ya que a nivel *in vitro* los cultivos mixtos de *Leishmania* pertenecientes a distintas especies tienden a generar un comportamiento antagónico en donde una de las especies resulta ser más beneficiada (Babiker et al., 2014; Pacheco, Culinienior, y Morel, 1987). Sin embargo, también no se pudo descartar la presencia de híbridos de *Leishmania* que pudieron ser el resultado de organismos que tuvieron un ancestro común, en donde han logrado retener algunas características genotípicas y fenotípicas entre subgéneros o especies relacionados (Belli, Miles, y Kelly, 1994).

El estadístico de prueba ( $X^2$ ) demostró que no existió una relación significativa entre la presencia del parásito con respecto al género de los pacientes, corroborando que no existe la discriminación en el apareamiento del parásito en base al género (Weigel y Armijos 2001). Sin embargo, se puede observar en el gráfico de barras de la Figura 28 que la presencia del agente etiológico fue un poco mayor en el género masculino que en el femenino, pero sin significancia estadística. Esto se pudo deber a que las personas del género masculino, por lo general, se encuentran más expuestas debido que estas trabajan en varias

actividades al aire libre como la cacería y la agricultura. Generalmente, es en dichas actividades en donde la transmisión cíclica de *Leishmania* se desarrolla con más facilidad (Calvopiña et al., 2004). Ante ello, también se sabe que los pacientes del género masculino tienen un riesgo de tres veces mayor de obtener la enfermedad en comparación con los pacientes femeninos (Weigel et al. 1994).

**Tabla cruzada Sexo\*Presencia**

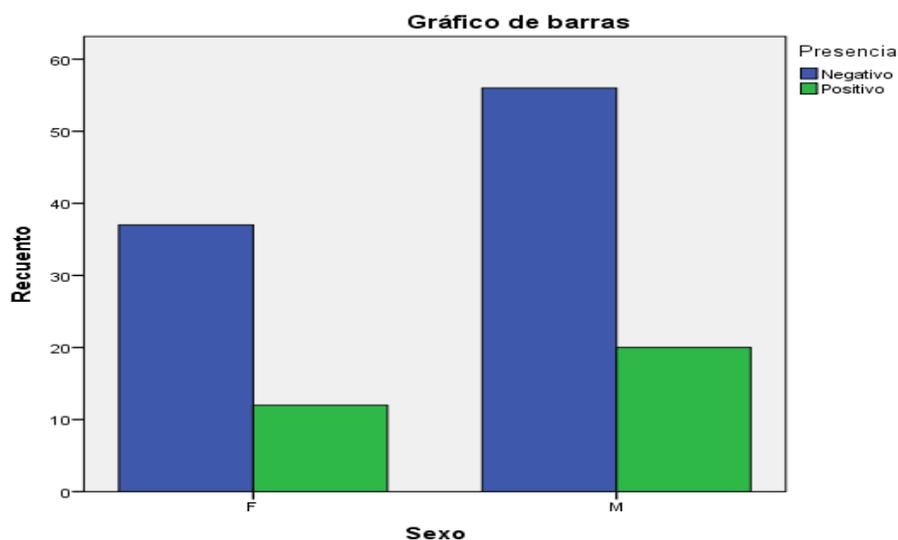
Recuento		Presencia		Total
		Negativo	Positivo	
Sexo	F	37	12	49
	M	56	20	76
Total		93	32	125

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,052 <sup>a</sup>	1	,819		
Corrección de continuidad <sup>b</sup>	,000	1	,985		
Razón de verosimilitud	,052	1	,819		
Prueba exacta de Fisher				1,000	,496
N de casos válidos	125				

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 12,54.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2



**Figura 28.** Análisis estadístico por chi cuadrado ( $\chi^2$ ) para la comparación entre la prevalencia del agente etiológico con respecto al género del paciente infectado, mediante el uso del paquete estadístico SPSS a un nivel de confianza del 95%.

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1. Conclusiones

Dados los resultados obtenidos en el presente estudio se puede concluir diversos puntos importantes:

Los marcadores cromosómicos *nagA* y *cpb* mostraron ser óptimos para la diferenciación entre los dos subgéneros ya que diversos estudios de genómica comparativa sostuvieron que los niveles de conservación nucleotídica entre las especies de cada subgénero son muy altos.

El método de Chelex para la extracción de ADN puede ser muy útil para la obtención de altas concentraciones de material genómico, sin embargo, este puede producir dificultades ya que, debido a la carencia de un proceso de purificación, puede dejar remanentes contaminantes que pueden inhibir a la PCR.

Los cebadores diseñados en este estudio, a pesar de que mostraron análisis termodinámicos desfavorables, fueron factibles para la estandarización de la PCR múltiple, sin embargo, al tener nucleótidos degenerados, esto pudo influir en gran parte con respecto a la cinética de la reacción de PCR múltiple.

En términos de sensibilidad y efectividad, la PCR presenta mayores ventajas a comparación de la microscopía en el caso de procesabilidad de un gran número de muestras a menor tiempo, a diferencia de la microscopía que requiere de mucho tiempo de estudio por muestra para obtener porcentajes de sensibilidad considerables.

En términos de especificidad, la microscopía demostró un gran número de resultados que coincidieron con la PCR, demostrando que la experticia del microscopista influye de gran manera en el rendimiento de la microscopía.

Existió mayor prevalencia del subgénero *Viannia* en las muestras recolectadas, concordando con otros estudios que indicaron que en la Amazonía prevalecen especies como *L. braziliensis*, *L. naiffi*, *L. lainsoni* y *L. panamensis*.

Se ha detectado la presencia de coinfecciones de especies pertenecientes a dos subgéneros en pacientes afectados, este resultado también puede mostrar la presencia de posibles especies híbridas.

La presencia del agente etiológico no se relaciona con el género del paciente, sin embargo, por lo general, el género masculino es más susceptible por sus actividades al aire libre.

## **6.2. Recomendaciones**

Para mayor fiabilidad de la técnica, se recomienda aplicarla en cepas altamente caracterizadas.

También se recomienda la mejora de la técnica mediante la adición de cebadores discriminantes por especies (separados por subgéneros), permitiendo así la obtención de un resultado más puntual y específico.

Se recomienda ver la viabilidad de la técnica en otras zonas geográficas ubicadas en el continente americano.

## REFERENCIAS

- Akhavan, A. A., Mirhendi, H., Khamesipour, A., Alimohammadian, M. H., Rassi, Y., Bates, P. Bates, P., Kamhawi, S., Valenzuela, JG., Arandian, MH., Abdoli, H., Jalali-Zand, N., Jafari, R., Shareghi, N., Ghanei, M., y Yaghoobi-Ershadi, M. R. (2010). *Leishmania species: Detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. Experimental Parasitology*, 126(4), 552–556. Recuperado el 3 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.003>
- Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., Ravel, C., Marty, P., Delaunay, P., Kasbari, M., Granouillac, B., y Sereno, D. (2017). *Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. Molecular Aspects of Medicine*, 57, 1–29. Recuperado el 2 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>
- Akhoundi, M., Hajjaran, H., Baghaei, A., y Mohebalí, M. (2013). *Geographical Distribution of Leishmania Species of Human Cutaneous Leishmaniasis in Fars Province, Southern Iran. Iranian Journal of Parasitology*, 8(1), 85–91. Recuperado el 4 de Agosto de 2018 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3655245/>
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., y Sereno, D. (2016). *A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), e0004349. Recuperado el 6 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Alaba, J. (1992). *Studies on leishmaniasis in an endemic focus of Leishmania on the Pacific coast of Ecuador. In: Studies on New World Leishmaniasis and its Transmission with Particular Reference to Ecuador. Res Resp Series*, 59–69.
- Alabedra, J. (1952). El boton de oriente en el Ecuador: Ulcera tropical, leishmaniosis americana. I. de la U. de Guayaquil, Ed. Guayaquil.

- Aleman, C. (1969). *Finestructure of cultured Leishmania brasiliensis*. *Experimental Parasitology*, 24(2), 259–264. Doi: 10.1016/0014-4894(69)90163-5
- Alemayehu, B., y Alemayehu, M. (2017). *Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host*. *Health Sci*, 11, 1–6.
- Almeida, M. C. de, Vilhena, V., Barral, A., y Barral-Netto, M. (2003). *Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 861–870. Recuperado el 10 de Agosto de 2018 de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762003000700001&ynrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762003000700001&ynrm=iso)
- Alten, B., Maia, C., Afonso, M. O., Campino, L., Jiménez, M., González, E., y Gradoni, L. (2016). *Seasonal Dynamics of Phlebotomine Sand Fly Species Proven Vectors of Mediterranean Leishmaniasis Caused by Leishmania infantum*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(2), e0004458. Doi: 10.1371/journal.pntd.0004458
- Alvar, J. (1994). *Leishmaniasis and AIDS co-infection: The Spanish example*. *Parasitology Today*, 10(4), 160–163. Doi: 10.1016/0169-4758(94)90270-4
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., y Team, the W. H. O. L. C. (2012). *Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence*. *PLOS ONE*, 7(5), e35671. Doi: 10.1371/journal.pone.0035671
- Antinori, S., Calattini, S., Longhi, E., Bestetti, G., Piolini, R., Magni, C., y Corbellino, M. (2007). *Clinical Use of Polymerase Chain Reaction Performed on Peripheral Blood and Bone Marrow Samples for the Diagnosis and Monitoring of Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected and HIV-Uninfected Patients: A Single-Center, 8-Year Experience in Italy and Review*. *Clinical Infectious Diseases*, 44(12), 1602–1610. Doi: 10.1086/518167
- Antoine, J. C., Prina, E., Jouanne, C., y Bongrand, P. (1990). *Parasitophorous*

*vacuoles of Leishmania amazonensis-infected macrophages maintain an acidic pH. Infection and Immunity, 58(3), 779–787. Recuperado el 11 de Agosto de 2018 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC258533/>*

- Armijos, R., Chico, M. ., Cruz, M. ., Guderian, R. ., Kreutzer, R. ., Berman, J. D., y Grögl, M. (1990). *Human cutaneous leishmaniasis in Ecuador: identification of parasites by enzyme electrophoresis. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 424–428.*
- Ashford, R. W. (2000). *The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. International Journal for Parasitology, 30(12), 1269–1281. Doi: 10.1016/S0020-7519(00)00136-3*
- Babiker, A. M., Ravagnan, S., Fusaro, A., Hassan, M. M., Bakheit, S. M., Mukhtar, M. M., y Capelli, G. (2014). *Concomitant Infection with Leishmania donovani and L. major in Single Ulcers of Cutaneous Leishmaniasis Patients from Sudan. Journal of Tropical Medicine, 2014, 170859. Doi: 10.1155/2014/170859*
- Barros, V. C., Oliveira, J. S., Melo, M. N., y Gontijo, N. F. (2006). *Leishmania amazonensis: Chemotaxic and osmotaxic responses in promastigotes and their probable role in development in the phlebotomine gut. Experimental Parasitology, 112(3), 152–157. Doi: 10.1016/j.exppara.2005.10.005*
- Belli, A. A., Miles, M. A., y Kelly, J. M. (1994). *A putative Leishmania panamensis/Leishmania braziliensis hybrid is a causative agent of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. Parasitology, 109(4), 435–442. Doi: 10.1017/S0031182000080689*
- Berg, J. M., Stryer, L., Tymoczko, J. L., y Macarulla, J. M. (2007). *Bioquímica, Nueva York, Estados Unidos de América: Reverté. Recuperado el 12 de Agosto de 2018 de <https://books.google.com.ec/books?id=HRr4MNH2YssC>*
- Berman, J. D. (1997). *Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and*

- Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. Clinical Infectious Diseases*, 24(4), 684–703. Doi: 10.1093/clind/24.4.684
- Boité, M. C., Mauricio, I. L., Miles, M. A., y Cupolillo, E. (2012). *New Insights on Taxonomy, Phylogeny and Population Genetics of Leishmania (Viannia) Parasites Based on Multilocus Sequence Analysis. PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11), e1888. Doi: 10.1371/journal.pntd.0001888
- Bravo-Grau, S., y Cruz, J. P. (2015). Estudios de exactitud diagnóstica: Herramientas para su interpretación. *Revista Chilena de Radiología*, 21, 158–164.
- Brecher, M. E., y Hay, S. N. (2005). *Bacterial contamination of blood components. Clinical Microbiology Reviews*, 18(1), 195–204. Doi: 10.1128/CMR.18.1.195-204.2005
- Britto, C., Ravel, C., Bastien, P., Blaineau, C., Pagès, M., Dedet, J.-P., y Wincker, P. (1998). *Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World Leishmania genomes. Gene*, 222(1), 107–117. Doi: 10.1016/S0378-1119(98)00472-7
- Brustoloni, Y. M., Cunha, R. V, Dorval, M. E., Oshiro, E. T., Pontes, E. R. J. C., Oliveira, A. L. L., y Ribeiro, L. F. (2007). *Comparison of conventional methods for diagnosis of visceral leishmaniasis in children of the Center-West Region of Brazil. Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 11, 106–109. Recuperado el 20 de Agosto de 2018 de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttextypid=S1413-86702007000100023ynrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttextypid=S1413-86702007000100023ynrm=iso)
- Budelier, K., y Schorr, J. (1998). *Purification of DNA by Anion-Exchange Chromatography. Current Protocols in Molecular Biology*, 42(1), 2.1.11-2.1.18. Doi: 10.1002/0471142727.mb0201bs42
- Burchmore, R. J. S., Rodriguez-Contreras, D., McBride, K., Barrett, M. P., Modi, G., Sacks, D., y Landfear, S. M. (2003). *Genetic characterization of glucose transporter function in Leishmania mexicana. Proceedings of the*

*National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3901–3906. Doi: 10.1073/pnas.0630165100

Calvopiña, M., Aguirre, C., Cevallos, W., Castillo, A., Abbasi, I., y Warburg, A. (2017). *Coinfection of Leishmania guyanensis and Human Immunodeficiency Virus–Acquired Immune Deficiency Syndrome: Report of a Case of Disseminated Cutaneous Leishmaniasis in Ecuador. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (Vol. 96). Doi: 10.4269/ajtmh.16-0431

Calvopiña, M., Armijos, R., y Hashiguchi, Y. (2004). *Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: Current status of knowledge - A review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (Vol. 99). Doi: 10.1590/S0074-02762004000700001

Calvopiña, M., Armijos, R., Marco, J., Uezato, H., Kato, H., Gomez, E., y Hashiguchi, Y. (2006). *Leishmania isoenzyme polymorphisms in Ecuador: Relationships with geographic distribution and clinical presentation. BMC infectious diseases* (Vol. 6). Doi: 10.1186/1471-2334-6-139

Calvopiña, M., Armijos, R. X., Marco, J. D., Uezato, H., Kato, H., Gomez, E. A., y Hashiguchi, Y. (2006). *Leishmania isoenzyme polymorphisms in Ecuador: relationships with geographic distribution and clinical presentation. BMC Infectious Diseases*, 6, 139. Doi: 10.1186/1471-2334-6-139

Calvopiña, M., Martinez, L., y Hashiguchi, Y. (2013). *Cutaneous leishmaniasis “chiclero’s ulcer” in subtropical Ecuador. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(2), 195–196. Doi: 10.4269/ajtmh.12-0690

Cantacessi, C., Dantas-Torres, F., Nolan, M. J., y Otranto, D. (2015). *The past, present, and future of Leishmania genomics and transcriptomics. Trends in Parasitology*, 31(3), 100–108. Doi: 10.1016/j.pt.2014.12.012

CDC. (2017). *Leishmaniasis*. Recuperado el 29 de Noviembre de 2018 de

<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>

- Cella Conter, C., Valdrinez Campana Lonardoní, M., Alessi Aristides, S. M., Cardoso, R., y Gomes Verzignassi Silveira, T. (2017). *New primers for the detection Leishmania species by multiplex polymerase chain reaction. Parasitology Research* (Vol. 117). Doi: 10.1007/s00436-017-5726-1
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., y Boelaert, M. (2007). *Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nature Reviews Microbiology*, 5, S7. Recuperado el 30 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748z>
- Claborn, D. M. (2010). *The Biology and Control of Leishmaniasis Vectors. Journal of Global Infectious Diseases*, 2(2), 127–134. Doi: 10.4103/0974-777X.62866
- Coleman, R. E., Sattabongkot, J., Promstaporm, S., Maneechai, N., Tippayachai, B., Kengluetcha, A., y Khuntirat, B. (2006). *Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a Plasmodium falciparum/vivax endemic area in Thailand. Malaria Journal*, 5, 121. Doi: 10.1186/1475-2875-5-121
- Coughlan, S., Taylor, A. S., Feane, E., Sanders, M., Schonian, G., Cotton, J. A., y Downing, T. (2018). *Leishmania naiffi and Leishmania guyanensis reference genomes highlight genome structure and gene evolution in the Viannia subgenus. Royal Society Open Science*, 5(4), 172212. Doi: 10.1098/rsos.172212
- Coutinho-Abreu, I. V., Sharma, N. K., Robles-Murguía, M., y Ramalho-Ortigao, M. (2010). *Targeting the Midgut Secreted PpChit1 Reduces Leishmania major Development in Its Natural Vector, the Sand Fly Phlebotomus papatasi . PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(11), e901. Doi: 10.1371/journal.pntd.0000901
- Crommelin, D. J. A., Sindelar, R. D., y Meibohm, B. (2013). *Pharmaceutical*

*Biotechnology: Fundamentals and Applications*. Nueva York, Estados Unidos de América. Recuperado el 2 de Diciembre de 2018 de <https://books.google.com.ec/books?id=bU26BAAAQBAJ>

- Cupolillo, E., Medina-Acosta, E., Noyes, H., Momen, H., y Grimaldi Jr, G. (2000). *A Revised Classification for Leishmania and Endotrypanum*. *Parasitology Today*, 16(4), 142–144. Doi: 10.1016/S0169-4758(99)01609-9
- Da Silva, M. R., Stewart, J. A. Y. M., y Costa, C. (2005). *Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(6), 811–814. Doi: 10.4269/ajtmh.2005.72.811
- Dantas-Torres, F. (2007). *The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 149(3), 139–146. Doi: 10.1016/j.vetpar.2007.07.007
- Darling, A. C. E., Mau, B., Blattner, F. R., y Perna, N. T. (2004). *Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements*. *Genome Research*, 14(7), 1394–1403. Doi: 10.1101/gr.2289704
- Daszak, P., Cunningham, A. A., y Hyatt, A. D. (2001). *Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife*. *Acta Tropica*, 78(2), 103–116. Doi: 10.1016/S0001-706X(00)00179-0
- De Almeida, M. A., Batra, D., Lin, W., Herwaldt, B., Rowe, L. A., Sheth, M., y Myler, P. (2018). *Draft Whole Genome Sequence of Leishmania (V.) lainsoni isolated from Peruvian Clinical Case - Strain 217-99*. Recuperado el 3 de Febrero de 2019 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/RAIA000000000.1>
- de Cássia-Pires, R., de Melo, M. de F. A. D., Barbosa, R. da H., y Roque, A. L. R. (2017). *Multiplex PCR as a tool for the diagnosis of Leishmania spp. kDNA and the gapdh housekeeping gene of mammal hosts*. *PLoS ONE*,

12(3), e0173922. Doi: 10.1371/journal.pone.0173922

de Vries, H. J. C., Reedijk, S. H., y Schallig, H. D. F. H. (2015). *Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management*. *American Journal of Clinical Dermatology*, 16(2), 99–109. Doi: 10.1007/s40257-015-0114-z

Desjardins, P., y Conklin, D. (2010). *NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids*. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (45), 2565. Doi: 10.3791/2565

Dieffenbach, C., Lowe, T. M., y Dveksler, G. (1993). *General Concepts for PCR Primer Design*. *Genome Research*.

Donovan, C. (1903). *On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India*. *BMJ*, 1(2213), 201–202.

dos Santos Brighente, K. B., Cutolo, A. A., Motoie, G., da Silva Meira-Strejevitch, C., y Pereira-Chioccola, V. L. (2018). *Molecular detection of Leishmania (Leishmania) infantum in phlebotomine sandflies from a visceral leishmaniasis endemic area in northwestern of São Paulo State, Brazil*. *Acta Tropica*, 181, 1–5. Doi: 10.1016/j.actatropica.2018.01.012

Dovich, N. J., y Zhang, J. (2000). *How Capillary Electrophoresis Sequenced the Human Genome*. *Angewandte Chemie International Edition*, 39(24), 4463–4468. Doi: 10.1002/1521-3773(20001215)39:24<4463::AID-ANIE4463>3.0.CO;2-8

El-Salam, N., Ayas, S., y Ullah, R. (2014). *PCR and Microscopic Identification of Isolated Leishmania tropica from Clinical Samples of Cutaneous Leishmaniasis in Human Population of Kohat Region in Khyber Pakhtunkhwa*. *BioMed Research International*, 2014, 5. Doi: 10.1155/2014/861831

Emin, L., Balcioglu, C., Yereli, K., y Ozbel, Y. (1997). *A New Experimental In Vitro Culture Medium for Cultivation of Leishmania Species*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2430–2431.

Espinosa, O. A., Serrano, M. G., Camargo, E. P., Teixeira, M. M. G., y Shaw, J.

- J. (2018). *An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as Leishmania and Endotrypanum*. *Parasitology*, 145(4), 430–442. Doi: 10.1017/S0031182016002092
- Fleta Zaragozano, J., Rodríguez Martínez, G., y Clavel Parrilla, A. (2001). *Leishmaniasis visceral y cutaneomucosa: aspectos epidemiológicos y clínicos*. *Medicina Integral*, 38(6), 264–269. Recuperado el 20 de Diciembre de 2018 de <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-leishmaniasis-visceral-cutaneomucosa-aspectos-epidemiologicos-13020963>
- Forestier, C.-L., Machu, C., Loussert, C., Pescher, P., y Späth, G. F. (2011). *Imaging Host Cell-Leishmania Interaction Dynamics Implicates Parasite Motility, Lysosome Recruitment, and Host Cell Wounding in the Infection Process*. *Cell Host y Microbe*, 9(4), 319–330. Doi: 10.1016/j.chom.2011.03.011
- Gadelha, A. P. R., Cunha-e-Silva, N. L., y de Souza, W. (2013). *Assembly of the Leishmania amazonensis flagellum during cell differentiation*. *Journal of Structural Biology*, 184(2), 280–292. Doi: 10.1016/j.jsb.2013.09.006
- Galluzzi, L., Ceccarelli, M., Diotallevi, A., Menotta, M., y Magnani, M. (2018). *Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis*. *Parasites y Vectors*, 11(1), 273. Doi: 10.1186/s13071-018-2859-8
- Gluezn, E., Höög, J. L., Smith, A. E., Dawe, H. R., Shaw, M. K., y Gull, K. (2010). *Beyond 9+0: noncanonical axoneme structures characterize sensory cilia from protists to humans*. *The FASEB Journal*, 24(9), 3117–3121. Doi: 10.1096/fj.09-151381
- Goddard, J., y Zhou, L. (2007). *Physician's Guide to Arthropods of Medical Importance, 5th Edition*. *Emerging Infectious Diseases*, 13(9), 1442. Doi: 10.3201/eid1309.070706
- Gossage, S. M., Rogers, M. E., y Bates, P. A. (2003). *Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle*. *International Journal for Parasitology*,

- 33(10), 1027–1034. Recuperado el 3 de Enero de 2019 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2839921/>
- Granda, J. (2017). Anuario de vigilancia epidemiológica 1994-2017. (MSP, Ed.), Quito, Ecuador: Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica.
- Hajjaran, H., Mohebbali, M., Teimouri, A., Oshaghi, M. A., Mirjalali, H., Kazemi-Rad, E., y Naddaf, S. R. (2014). *Identification and phylogenetic relationship of Iranian strains of various Leishmania species isolated from cutaneous and visceral cases of leishmaniasis based on N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase gene. Infection, Genetics and Evolution*, 26, 203–212. Doi: 10.1016/j.meegid.2014.05.026
- Harris, E., Kropp, G., Belli, A., Rodriguez, B., y Agabian, N. (1998). *Single-Step Multiplex PCR Assay for Characterization of New World Leishmania Complexes. Journal of Clinical Microbiology*, 36(7), 1989–1995. Recuperado el 3 de Julio de 2018 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC104966/>
- Hashim, F. A., Ali, M. S., Satti, M., El-Hassan, A. M., Ghalib, H. W., Safi, S. El, y El Hag, I. A. (1994). *An outbreak of acute kala-azar in a nomadic tribe in western Sudan: Features of the disease in a previously non-immune population. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(4), 431–432. Recuperado el 7 de Julio de 2008 de [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(94\)90417-0](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(94)90417-0)
- Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., y Vogt, P. H. (1997). *Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. BioTechniques*, 23(3), 504–511. Doi: 10.2144/97233rr01
- Hepburn, N. C. (2003). *Cutaneous leishmaniasis: current and future management. Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 1(4), 563–570. Doi: 10.1586/14787210.1.4.563
- Hernández, M. ., Oliver, M., Martinez, C., y Planas, G. (2018). *Visceral leishmaniasis with cutaneous and rectal dissemination due to L. braziliensis in Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS).*

*International Journal of Dermatology*, 34(2), 114–115. Doi: 10.1111/j.1365-4362.1995.tb03592.x

Hide, M., y Bañuls, A. L. (2008). *Polymorphisms of cpb multicopy genes in the Leishmania (Leishmania) donovani complex*. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(2), 105–106. Recuperado el 7 de Noviembre de 2018 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.09.013>

Hide, M., Brasonçaves, R., y Bañuls, A. L. (2007). *Specific cpb copies within the Leishmania donovani complex: evolutionary interpretations and potential clinical implications in humans*. *Parasitology*, 134(3), 379–389. Doi: 10.1017/S0031182006001600

IDT. (2018). *OligoAnalyzer Tool*. Recuperado el 15 de Enero de 2019 de <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>

Jorquera, A., Gonzalez, R., Marchan-Marcano, E., Oviedo, M., y Matos, M. (2005). *Multiplex-PCR for detection of natural Leishmania infection in Lutzomyia spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 45–48. Recuperado el 8 de Junio de 2018 de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762005000100008&ynrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762005000100008&ynrm=iso)

Käser, S., Willemin, M., Schnarwiler, F., Schimanski, B., Poveda-Huertes, D., Oeljeklaus, S., y Schneider, A. (2017). *Biogenesis of the mitochondrial DNA inheritance machinery in the mitochondrial outer membrane of Trypanosoma brucei*. *PLOS Pathogens*, 13(12), e1006808. Doi: 10.1371/journal.ppat.1006808

Kato, H., Calvopiña, M., Criollo, H., y Hashiguchi, Y. (2013). *First cases of Leishmania (Viannia) naiffi infection in Ecuador and identification of its suspected vector species*. *Acta tropica (Vol. 128)*. Doi: 10.1016/j.actatropica.2013.09.001

Kato, H., Gomez, E., Martini Robled, L., Muzzio, J., Velez, L., Calvopiña, M., y

- Hashiguchi, Y. (2016). *Geographic Distribution of Leishmania Species in Ecuador Based on the Cytochrome B Gene Sequence Analysis*. *PLoS NTDs* (Vol. 10). Doi: 10.1371/journal.pntd.0004844
- Kato, H., Uezato, H., Katakura, K., Calvopiña, M., Marco, J., Barroso, P., y Hashiguchi, Y. (2005). *Detection and identification of Leishmania species within naturally infected sandflies in the Andean areas of Ecuador by polymerase chain reaction*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* (Vol. 72).
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., y Drummond, A. (2012). *Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data*. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(12), 1647–1649. Doi: 10.1093/bioinformatics/bts199
- Kerr, S. F. (2000). *Palaeartic origin of Leishmania*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 75–80. Recuperado el 7 de Diciembre de 2018 de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttextpid=S0074-02762000000100011ynrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttextpid=S0074-02762000000100011ynrm=iso)
- Kerr, S. F., Merkelz, R., y MacKinnon, C. (2000). *Further support for a palaeartic origin of Leishmania*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 579–581. Recuperado el 8 de Octubre de 2018 de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttextpid=S0074-02762000000400022ynrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttextpid=S0074-02762000000400022ynrm=iso)
- Khalid, N. M., Aboud, M. A., Alrabba, F. M., Elnaiem, D.-E. A., y Tripet, F. (2012). *Evidence for genetic differentiation at the microgeographic scale in Phlebotomus papatasi populations from Sudan*. *Parasites y Vectors*, 5, 249. Doi: 10.1186/1756-3305-5-249
- Khan, M. G. M., Bhaskar, K. R. H., Salam, M. A., Akther, T., Pluschke, G., y Mondal, D. (2012). *Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of Leishmania DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients*. *Parasites y Vectors*, 5, 280. Doi: 10.1186/1756-3305-5-280

- Kohanteb, J., Ardehali, S. M., y Rezai, H. R. (1987). *Detection of Leishmania donovani soluble antigen and antibody in the urine of visceral leishmaniasis patients. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(4), 578–580. Recuperado el 7 de Septiembre de 2018 de [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(87\)90414-7](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(87)90414-7)
- Lacomble, S., Vaughan, S., Gadelha, C., Morphew, M. K., Shaw, M. K., McIntosh, J. R., y Gull, K. (2009). *Three-dimensional cellular architecture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography. Journal of Cell Science*, 122(8), 1081–1090. Doi: 10.1242/jcs.045740
- Leishman, W. B. (1903). *On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. BMJ*, 1(2213), 1252–1254. Doi: 10.1136/bmj.1.2213.1252
- Lorenz, T. C. (2012). *Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (63), e3998–e3998. Doi: 10.3791/3998
- Lozano, N., Colunga, P., Sánchez-Pineda, L., Sánchez Montes, S., y Becker, I. (2018). Sauroleishmania, protozoarios asociados con reptiles: Distribución, Vectores y Hospederos. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 1, 43–52.
- Lysenko, A. J. (1971). *Distribution of leishmaniasis in the Old World. Bulletin of the World Health Organization*, 44(4), 515–520. Recuperado el 8 de Septiembre de 2018 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2427824/>
- Magill, A. J., Grogl, M., Gasser, R. A., Sun, W., y Oster, C. N. (1993). *Visceral Infection Caused by Leishmania tropica in Veterans of Operation Desert Storm. New England Journal of Medicine*, 328(19), 1383–1387. Doi: 10.1056/NEJM199305133281904
- Mann, T., Humbert, R., Dorschner, M., Stamatoyannopoulos, J., y Noble, W. S. (2009). *A thermodynamic approach to PCR primer design. Nucleic Acids Research*, 37(13), e95–e95. Doi: 10.1093/nar/gkp443

- Markoulatos, P., Samara, V., Siafakas, N., Plakokefalos, E., Spyrou, N., y Moncany, M. L. J. (1999). *Development of a quadruplex polymerase chain reaction for human cytomegalovirus detection. Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 13(3), 99–105. Doi: 10.1002/(SICI)1098-2825(1999)13:3<99::AID-JCLA2>3.0.CO;2-E
- Markoulatos, P., Siafakas, N., y Moncany, M. (2002). *Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(1), 47–51. Doi: 10.1002/jcla.2058
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., y Gradoni, L. (2012). *Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. Medical and Veterinary Entomology*, 27(2), 123–147. Doi: 10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x
- Marshall, L. G., Webb, S. D., Sepkoski, J. J., y Raup, D. M. (1982). *Mammalian Evolution and the Great American Interchange. Science*, 215(4538), 1351–1357. Doi: 10.1126/science.215.4538.1351
- Martins, A. L. G. P., Barreto, J. A., Lauris, J. R. P., y Martins, A. C. G. P. (2014). *American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. Anais Brasileiros de Dermatologia*, 89(1), 52–58. Doi: 10.1590/abd1806-4841.20142226
- McEntyre, J., y Ostell, J. (2002). *The NCBI Handbook* (1st ed.). Bethesda, Estados Unidos de América: National Library of Medicine.
- McGinnis, S., y Madden, T. L. (2004). *BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. Nucleic Acids Research*, 32 Doi: 10.1093/nar/gkh435
- Meireles, C. B., Maia, L. C., Soares, G. C., Teodoro, I. P. P., Gadelha, M. do S. V., da Silva, C. G. L., y de Lima, M. A. P. (2017). *Atypical presentations of cutaneous leishmaniasis: A systematic review. Acta Tropica*, 172, 240–254. Doi: 10.1016/j.actatropica.2017.05.022
- Miranda, A., Saldaña, A., González, K., Paz, H., Santamaría, G., Samudio, F., y

- Calzada, J. E. (2012). *Evaluation of PCR for cutaneous leishmaniasis diagnosis and species identification using filter paper samples in Panama, Central America. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(9), 544–548. Doi: 10.1016/j.trstmh.2012.05.005
- Momen, H., y Cupolillo, E. (2000). *Speculations on the origin and evolution of the genus Leishmania. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 583–588. Recuperado el 20 de Octubre de 2018 de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttextpid=S0074-02762000000400023ynrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttextpid=S0074-02762000000400023ynrm=iso)
- Montalban, C., Martinez-Fernandez, R., Calleja, J. L., Garcia-Diaz, J. de D., Rubio, R., Drona, F., y Costa, J. R. (1989). *Visceral Leishmaniasis (Kala-Azar) as an Opportunistic Infection in Patients Infected with the Human Immunodeficiency Virus in Spain. Reviews of Infectious Diseases*, 11(4), 655–660. Recuperado el 9 de Septiembre de 2018 de <http://dx.doi.org/10.1093/clinids/11.4.655>
- MSP. (2013). Manual de procedimientos del subsistema alerta acción SIVE - ALERTA (Segunda Ed). Quito, Ecuador: MSP.
- MSP. (2014). Gaceta epidemiológica N° 51 SIVE-ALERTA. Quito, Ecuador: MSP.
- MSP. (2016). Décimo primer Boletín Epidemiológico. Quito, Ecuador: MSP.
- MSPSC. (2018). Gobierno evalúa impacto de la migración venezolana en la salud. Recuperado el 15 de Agosto de 2018 de <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/Gobierno-evalua-impacto-de-la-migracion-venezolana-en-la-salud.aspx>
- Neitzke-Abreu, H. C., Venazzi, M. S., de Lima Scodro, R. B., Zanzarini, P. D., da Silva Fernandes, A. C. B., Aristides, S. M. A., y Lonardoní, M. V. C. (2014). *Cutaneous leishmaniasis with atypical clinical manifestations: Case report. IDCases*, 1(3), 60–62. Doi: 10.1016/j.idcr.2014.07.003
- Noyes, H. (1998). *Implications of a Neotropical Origin of the Genus Leishmania*.

*Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 93, 657–662. Recuperado el 15 de Julio de 2018 de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttextpid=S0074-02761998000500017ynrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttextpid=S0074-02761998000500017ynrm=iso)

- Ogbadoyi, E. O., Robinson, D. R., y Gull, K. (2003). *A High-Order Trans-Membrane Structural Linkage Is Responsible for Mitochondrial Genome Positioning and Segregation by Flagellar Basal Bodies in Trypanosomes*. *Molecular Biology of the Cell*, 14(5), 1769–1779. Doi: 10.1091/mbc.E02-08-0525
- Olalla, H. R., Velez, L. N., Kato, H., Hashiguchi, K., Caceres, A. G., Gomez, E. A., y Hashiguchi, Y. (2015). *An analysis of reported cases of leishmaniasis in the southern Ecuadorian Amazon region, 1986–2012*. *Acta Tropica*, 146, 119–126. Doi: 10.1016/j.actatropica.2015.03.015
- OMS. (2018). *Leishmaniasis*. Recuperado el 29 de Noviembre de 2018 de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- OPS. (2017). *Leishmaniasis en las Américas para el público general*. Recuperado el 15 de Febrero de 2018 de [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_contentyview=articleyid=9470%3Aleishmaniasis-for-the-general-publicycatid=6648%3Afact-sheetsyItemid=40721ylang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_contentyview=articleyid=9470%3Aleishmaniasis-for-the-general-publicycatid=6648%3Afact-sheetsyItemid=40721ylang=es)
- Osman, O. F., Oskam, L., Zijlstra, E. E., Kroon, N. C., Schoone, G. J., Khalil, E. T., y Kager, P. A. (1997). *Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(10), 2454 LP-2457. Recuperado El 7 de Noviembre de 2018 de <http://jcm.asm.org/content/35/10/2454.abstract>
- Özkeklikçi, A., Karakuş, M., Özbel, Y., y Töz, S. (2017). *The new situation of cutaneous leishmaniasis after Syrian civil war in Gaziantep city, Southeastern region of Turkey*. *Acta Tropica*, 166, 35–38. Doi: 10.1016/j.actatropica.2016.10.019
- Pacheco, R. S., Culinienior, G., y Morel, C. M. (1987). *Inhibition of growth of*

*Leishmania mexicana mexicana* by *Leishmania mexicana amazonensis* during “in vitro” co-cultivation. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 82, 537–542. Recuperado el 2 de Febrero de 2019 de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttextpid=S0074-02761987000400011ynrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttextpid=S0074-02761987000400011ynrm=iso)

Perez, J., Veland, N., Espinosa, D., Torres, K., Ogusuku, E., Llanos-Cuentas, A., y Arévalo, J. (2007). *Isolation and molecular identification of Leishmania ( Viannia ) peruviana from naturally infected Lutzomyia peruensis (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz. Scielo.*

Petropolis, D. B., Rodrigues, J. C. F., Viana, N. B., Pontes, B., Pereira, C. F. A., y Silva-Filho, F. C. (2014). *Leishmania amazonensis promastigotes in 3D Collagen I culture: an in vitro physiological environment for the study of extracellular matrix and host cell interactions. PeerJ*, 2, e317. Doi: 10.7717/peerj.317

Prediger, E. (2018). *Designing PCR primers and probes*. Recuperado el 5 de Febrero de 2019 de <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/designing-pcr-primers-and-probes>

Real, F., Mortara, R. A., y Rabinovitch, M. (2010). *Fusion between Leishmania amazonensis and Leishmania major Parasitophorous Vacuoles: Live Imaging of Coinfected Macrophages. PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(12), e905. Doi: 10.1371/journal.pntd.0000905

Real, F., Vidal, R. O., Carazzolle, M. F., Mondego, J. M. C., Costa, G. G. L., Herai, R. H., y Bahia, D. (2013). *The genome sequence of Leishmania (Leishmania) amazonensis: functional annotation and extended analysis of gene models. DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 20(6), 567–581. Doi: 10.1093/dnares/dst031

Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., y Brooker, S. (2007). *Cutaneous leishmaniasis. The Lancet Infectious Diseases*,

- 7(9), 581–596. Doi: 10.1016/S1473-3099(07)70209-8
- Remm, M., y Koressaar, T. (2007). *Enhancements and modifications of primer design program Primer3. Bioinformatics*, 23(10), 1289–1291. Doi: 10.1093/bioinformatics/btm091
- Rezvan, H., Nourian, A. reza, y Hamoon Navard, S. (2017). *An Overview on Leishmania Diagnosis. JoMMID*, 5(1), 1–11. Doi: 10.29252/JoMMID.5.1.2.1
- Rodríguez, N., Guzman, B., Rodas, A., Takiff, H., Bloom, B. R., y Convit, J. (1994). *Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. Journal of Clinical Microbiology*, 32(9), 2246–2252. Recuperado el 24 de Noviembre de 2018 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7814554>
- Rogers, M. E., Chance, M. L., y Bates, P. A. (2002). *The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of Leishmania mexicana by the sandfly Lutzomyia longipalpis. Parasitology*, 124(5), 495–507. Doi: 10.1017/S0031182002001439
- Rojas, R., Valderrama, L., Valderrama, M., Varona, M. X., Ouellette, M., y Saravia, N. G. (2006). *Resistance to Antimony and Treatment Failure in Human Leishmania (Viannia) Infection. The Journal of Infectious Diseases*, 193(10), 1375–1383. Doi: 10.1086/503371
- Roque, A. L. R., y Jansen, A. M. (2014). *Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(3), 251–262. Doi: 10.1016/j.ijppaw.2014.08.004
- Ross, R. (1903). *Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. British Medical Journal*, 2(2237), 1261–1262. Recuperado el 20 de Septiembre de 2018 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2514667/>
- Saenz, R. E., de Rodriguez, C. G., Johnson, C. M., y Berman, J. D. (1991). *Efficacy and Toxicity of Pentostam against Panamanian Mucosal*

*Leishmaniasis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 44(4).*

Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A. R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74(12), 5463 LP-5467.* Recuperado el 8 de Diciembre de 2018 de <http://www.pnas.org/content/74/12/5463.abstract>

Santrich, C., Moore, L., Sherwin, T., Bastin, P., Brokaw, C., Gull, K., y LeBowitz, J. H. (1997). *A motility function for the paraflagellar rod of Leishmania parasites revealed by PFR-2 gene knockouts. Molecular and Biochemical Parasitology, 90(1), 95–109.* Doi: 10.1016/S0166-6851(97)00149-7

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., y Johne, R. (2012). *PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. Journal of Applied Microbiology, 113(5), 1014–1026.* Doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x

Seaman, J., AJ, M., Sondorp, H., y BL, H. (1996). *Epidemic visceral leishmaniasis in southern sudan: Treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. Annals of Internal Medicine, 124(7), 664–672.* Recuperado el 5 de Agosto de 2018 de <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-124-7-199604010-00007>

Sarkari, B., Chance, M., y Hommel, M. (1992). *A Capture ELISA for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis Using a Monoclonal Antibody against a Leishmanial. Iranian Biomedical Journal (Vol. 9).*

Sidstedt, M., Hedman, J., Romsos, E. L., Waitara, L., Wadsö, L., Steffen, C. R., y Rådström, P. (2018). *Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 410(10), 2569–2583.* Doi: 10.1007/s00216-018-0931-z

Singh, U. A., Kumari, M., y Iyengar, S. (2018). *Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. Biological Procedures Online, 20, 12.*

Doi: 10.1186/s12575-018-0077-6

- Sinha, R., Arora, S. K., Datta, U., y Sehgal, S. (2018). *Detection of Leishmania Antigen in Kala Azar Patients Using Monoclonal Antibodies. Microbiology and Immunology*, 36(4), 391–400. Doi: 10.1111/j.1348-0421.1992.tb02038.x
- Sint, D., Raso, L., y Traugott, M. (2012). *Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. Methods in Ecology and Evolution*, 3(5), 898–905. Doi: 10.1111/j.2041-210X.2012.00215.x
- Smith, T. F., y Waterman, M. S. (1981). Identification of common molecular subsequences. *Journal of Molecular Biology*, 147(1), 195–197. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90087-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90087-5)
- Souza, A. I., Nunes, V. L. B., Borralho, V. M., y Ishikawa, E. A. Y. (2009). *Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul state, Brazil: a case report. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 15, 359–365. Recuperado 5 de Junio de 2018 de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttextypid=S1678-91992009000200017ynrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttextypid=S1678-91992009000200017ynrm=iso)
- Stauch, A., Duerr, H.-P., Picado, A., Ostyn, B., Sundar, S., Rijal, S., y Eichner, M. (2014). *Model-Based Investigations of Different Vector-Related Intervention Strategies to Eliminate Visceral Leishmaniasis on the Indian Subcontinent. PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(4), e2810. Doi: 10.1371/journal.pntd.0002810
- Stebut, E. (2015). *Leishmaniasis. JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 13(3), 191–201. Doi: 10.1111/ddg.12595
- Steinert, M., y van Assel, S. (1967). *The loss of kinetoplastic DNA in two species of trypanosomatidae treated with acriflavine. The Journal of Cell Biology*, 34(2), 489–503. Recuperado el 12 de Diciembre de 2019 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2107302/>

- Steverding, D. (2017). *The history of leishmaniasis*. *Parasites y Vectors*, 10, 82. Doi: 10.1186/s13071-017-2028-5
- Sunter, J., y Gull, K. (2017). *Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding*. *Open Biology*, 7(9), Doi: 10.1098/rsob.170165
- ThermoScientific. (2015). *Platinum<sup>TM</sup> Taq DNA Polymerase*. Recuperado el 3 de Febrero de 2019 de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10966026>
- Thomaz-Soccol, V., Lanotte, G., Rioux, R., Pratlong, F., Martini-Dumas, A., y Serres, E. (1993). *Monophyletic origin of the genus Leishmania Ross, 1903*. *Annales de parasitologie humaine et comparée* (Vol. 68).
- Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., y Arenas, R. (2017). *Leishmaniasis: a review*. *F1000Research*, 6, 750. Doi: 10.12688/f1000research.11120.1
- Travi, B. L., Cordeiro-da-Silva, A., Dantas-Torres, F., y Miró, G. (2018). *Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(1), e0006082. Doi: 10.1371/journal.pntd.0006082
- Tuon, F. F., Amato Neto, V., y Sabbaga Amato, V. (2008). *Leishmania: origin, evolution and future since the Precambrian*. *FEMS Immunology y Medical Microbiology*, 54(2), 158–166. Doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00455.x
- Turetz, M. L., Machado, P. R., Ko, A. I., Alves, F., Bittencourt, A., Almeida, R. P., y Carvalho, E. M. (2002). *Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil*. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(12), 1829–1834. Doi: 10.1086/345772
- van Dijk, E. L., Jaszczyszyn, Y., Naquin, D., y Thermes, C. (2018). *The Third Revolution in Sequencing Technology*. *Trends in Genetics*, 34(9), 666–681. Doi: 10.1016/j.tig.2018.05.008

- Wheeler, R. J., Sunter, J. D., y Gull, K. (2016). *Flagellar pocket restructuring through the Leishmania life cycle involves a discrete flagellum attachment zone*. *Journal of Cell Science*, 129(4), 854–867. Doi: 10.1242/jcs.183152
- Xia, X. (2007). *Bioinformatics and the Cell* (1st ed.). Nueva York, Estados Unidos de América: Springer US.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., y Madden, T. L. (2012). *Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. Doi: 10.1186/1471-2105-13-134
- Zerpa, O., y Convit, J. (2009). *Leishmaniasis cutánea difusa en Venezuela*. *Gazeta Médica da Bahia*, 79, 30-34.

## **ANEXOS**

## Anexo 1

### Alineamientos locales de los genes *cpb* y *nagA* en especies pertenecientes a los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*

	1	10	20	30	40	50	60
L. panamensis extraction	GCAACATAGAGTCGCAGTGGTACGTTACCACCCACTCGCTGATTACCCTGTCGGAGCAGG						
L. guyanensis extraction	GCAACATAGAGTCGCAGTGGTACGTTACCACCCACTCGCTGATTACCCTGTCGGAGCAGG						
L. peruviana extraction	GCAACATAGAGTCGAAGTGGTACCTTGCCACCCACTCGCTGATCTCCCTGTCGGAGCAGG						
L. braziliensis extraction	GCAACATAGAGTCGAAGTGGTACCTTGCCACCCACTCGCTGATCTCCCTGTCGGAGCAGG						
L. panamensis extraction	GCAACATAGAGTCGCAGTGGTACGTTACCACCCACTCGCTGATTACCCTGTCGGAGCAGG						
L. panamensis extraction	AGCTGGTGAGCTGCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGCCTGATGCTGCAGGCAT						
L. guyanensis extraction	AGCTGGTGAGCTGCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGCCTGATGCTGCAGGCAT						
L. peruviana extraction	AGCTGGTGAGCTGCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGCCTGATGCTGCAGGCAT						
L. braziliensis extraction	AGCTGGTGAGCTGCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGCCTGATGCTGCAGGCAT						
L. panamensis extraction	AGCTGGTGAGCTGCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGCCTGATGCTGCAGGCAT						
L. panamensis extraction	TCGACTGGCTGCTGAACAATAAGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTACCCCTACG						
L. guyanensis extraction	TCGACTGGCTGCTGAACAATAAGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTACCCCTACG						
L. peruviana extraction	TTGACTGGCTGCTGAACAATAGGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTACCCCTACG						
L. braziliensis extraction	TTGACTGGCTGCTGAACAATAGGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTACCCCTACG						
L. panamensis extraction	TCGACTGGCTGCTGAACAATAAGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTACCCCTACG						
L. panamensis extraction	TGCTGGTAATGGTAGTGTGCCCGAGTGCTCG						
L. guyanensis extraction	TGCTGGTAATGGTAGTGTGCCCGAGTGCTCG						
L. peruviana extraction	TGCTGGTAATGGTAGTGTGCCCGAGTGCTCG						
L. braziliensis extraction	TGCTGGTAATGGTAGTGTGCCCGAGTGCTCG						
L. panamensis extraction	TGCTGGTAATGGTAGTGTGCCCGAGTGCTCG						

	1	10	20	30	40	50	60
L. mexicana extraction	CGTCATGACCATCTCGCCCCACATCGAGGCACGGTGCAACTACGAGAAGATACGCCATCT						
L. major extraction	CGTCATGACCATCTCGCCACACATCGATGCACGGTGCAACTACGAGAAGGTAAGGTACCT						
L. infantum extraction	CGTCATGACCATCTCGCCACACATCGAGGCACGGTGTAACACGAGAAGATACGCCACCT						
L. donovani extraction	CGTCATGACCATCTCGCCACACATCGAGGCACGGTGTAACACGAGAAGATACGCCACCT						
L. arabica extraction	CGTCATGACCATCTCGCCACACATAGAGGCACGGTGCAACTACGAGAAGGTACGGCACCT						
L. amazonensis extraction	CGTCATGACCATCTCGCCACACATCGAGGCACGGTGCAACTACGAGAAGATACGCCATCT						
L. aethiopica extraction	CGTCATGACCATCTCGCCACACATCGAGGCACGGTGCAACTACGAGAAGATACGCCACCT						
L. mexicana extraction	GCTCAAGAAGAAGGTGCGCGTTCGGCATGACCGCGCCGCCACCAAGTCGGAGAT						
L. major extraction	GCTGGAGAAGAAGGTGCGCGTTGCGCTCGGGCACGACCGCGCCGCTCCAAGTCGGAGAT						
L. infantum extraction	CCTCGAGAAGAAGGTGCGCGTTGCCCTCGGGCACGACCGCGCCGCTCCAAGTCGGAGAT						
L. donovani extraction	CCTCGAGAAGAAGGTGCGCGTTGCCCTCGGGCACGACCGCGCCGCTCCAAGTCGGAGAT						
L. arabica extraction	GCTGGAGAAGAAGGTGCGCGTTGCGCTCGGGCACGACCGCGCCGCTCCAAGTCGGAGAT						
L. amazonensis extraction	GCTCAAGAAGAAGGTGCGCGTTCGGCATGACCGCGCCGCCACCAAGTCGGAGAT						
L. aethiopica extraction	GCTGGAGAAGAAGGTGCGCGTTCGGCATGACCGCGCCGCCACCAAGTCGGAGAT						
L. mexicana extraction	CATGTGCGCTCTCAAGCTGGCGCGTTCGGAGGAGGAGAAGATGCATGTTACCCACTTGTG						
L. major extraction	CATGGGCGCCCTCAAGCTGGCAGCGTTCGGAGGAGGAGAAGATGCATGTTACCCACTTGTG						
L. infantum extraction	TATGGGCGCCCTCAAGCTGGCAGCTTCGGAGGAGGAGAAGATGCATGTTACCCACTTGTG						
L. donovani extraction	TATGGGCGCCCTCAAGCTGGCAGCTTCGGAGGAGGAGAAGATGCATGTTACCCACTTGTG						
L. arabica extraction	CATGGGCGCCCTCAAGCTGGCAGCGTTCAGAGGAGGAGAAGATGCATGTTACCCACTTGTG						
L. amazonensis extraction	CATGTGCGCCCTCAAGCTGGCGCGTTCGGAGGAGGAGAAGATGCATGTTACCCACTTGTG						
L. aethiopica extraction	CATGGGCGCCCTCAAGCTCGCAGTGTTCGGAGGAGGAGAAGATGCATGTTACCCACTTGTG						
L. mexicana extraction	CAACGTCTCCACCTTCAATCACCCTGCCAGCTCACTGGTGAACCGCGCCATGTGCCCGCG						
L. major extraction	TAACGTCTCCACCTTCAATCACCCTGCCAGCTCACTGGTGAACCGCGCCATGTGCCCGCG						
L. infantum extraction	CAACGTCTCCACCTTCAATCACCCTGCCAGCTCACTGGTGAACACGGCCATGTGTCCGCG						
L. donovani extraction	CAACGTCTCCACCTTCAATCACCCTGCCAGCTCACTGGTGAACACGGCCATGTGCCCGCG						
L. arabica extraction	CAACGTCTCCACCTTCAATCACCCTGCCAGCTCACTGGTGAACCGCGCCATGTGCCCGCG						
L. amazonensis extraction	CAACGTCTCCACCTTCAATCACCCTGCCAGCTCACTGGTGAACGTGGCCATGTGCCCGCG						
L. aethiopica extraction	TAACGTCTCCACCTTCAATCACCCTGCCAGCTCACTGGTGAACGTGGCCATGTGCCCGCG						
L. mexicana extraction	GTTCCGAAACGCCCCACTCTACAAAGGGGCGCGCCGCCAACCGCTGGAGATCATTGCTGA						
L. major extraction	GTTCCGAAACGCGCCGCTCTACAAAGGGGCGCGTCCGCCAACCGCTGGAGATCATTGCTGA						
L. infantum extraction	GTTCCGAAACGCGCCGCTCTACAAAGGTGCGCGCCGCCAACCGCTGGAGATCATTGCTGA						
L. donovani extraction	GTTCCGAAACGCGCCGCTCTACAAAGGTGCGCGCCGCCAACCGCTGGAGATCATTGCTGA						
L. arabica extraction	GTTCCGAAACGCGCCGCTCTACAAAGGGGCGCGTCCGCCAACCGCTGGAGATCATTGCTGA						
L. amazonensis extraction	GTTCCGAAACGCCCCACTCTACAAAGGGGCGCGCCGCCAACCGCTGGAGATCATTGCTGA						
L. aethiopica extraction	GTTCCGAAACGCGCCGCCCTACAAAGGGGCGCGTCCGCCAACCGCTGGAGATCATTGCTGA						

## Anexo 2

### Análisis de especificidad de cebadores diseñados para discriminación de subgénero *Viannia* en el paquete bioinformático Primer-BLAST (Sin nucleótidos degenerados)

#### Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	GCAACATAGAGTCGCAGTGG	20	59.00	55.00
Reverse primer	TAGCTAGCACCCGTGTACAC	20	59.19	55.00

#### Products on target templates

>[LN609243.1](#) Leishmania peruviana genome assembly Leishmania peruviana PAB-4377\_V1, chromosome : 8

```
product length = 3236
Forward primer 1 GCAACATAGAGTCGCAGTGG 20
Template 335149 .....
Reverse primer 1 TAGCTAGCACCCGTGTACAC 20
Template 331914 ..... 331933
```

```
product length = 172
Forward primer 1 GCAACATAGAGTCGCAGTGG 20
Template 335149 ..... 335130
Reverse primer 1 TAGCTAGCACCCGTGTACAC 20
Template 334978 .....A..... 334997
```

```
product length = 172
Forward primer 1 GCAACATAGAGTCGCAGTGG 20
Template 332085 .....A..... 332066
Reverse primer 1 TAGCTAGCACCCGTGTACAC 20
Template 331914 ..... 331933
```

>[XM\\_010705915.1](#) Leishmania panamensis cathepsin L-like protease (CPB), partial mRNA

```
product length = 172
Forward primer 1 GCAACATAGAGTCGCAGTGG 20
Template 470 ..... 489
Reverse primer 1 TAGCTAGCACCCGTGTACAC 20
Template 641 ..... 622
```

>[CP009377.1](#) Leishmania panamensis strain MHOM/PA/94/PSC-1 chromosome 8 sequence

```
product length = 172
Forward primer 1 GCAACATAGAGTCGCAGTGG 20
Template 359538 ..... 359519
Reverse primer 1 TAGCTAGCACCCGTGTACAC 20
Template 359367 ..... 359386
```

>[FR798982.1](#) Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 complete genome, chromosome 8

```
product length = 2954
Forward primer 1 GCAACATAGAGTCGCAGTGG 20
Template 327718 ..... 327699
Reverse primer 1 TAGCTAGCACCCGTGTACAC 20
Template 324765 ..... 324784
```

```
product length = 172
Forward primer 1 GCAACATAGAGTCGCAGTGG 20
Template 330500 ..... 330481
Reverse primer 1 TAGCTAGCACCCGTGTACAC 20
Template 330329 .....A..... 330348
```

```
product length = 2954
Forward primer 1 GCAACATAGAGTCGCAGTGG 20
Template 330500 ..... 330481
Reverse primer 1 TAGCTAGCACCCGTGTACAC 20
Template 327547 .....A..... 327566
```

```
product length = 172
Forward primer 1 GCAACATAGAGTCGCAGTGG 20
Template 327718 ..... 327699
Reverse primer 1 TAGCTAGCACCCGTGTACAC 20
Template 327547 .....A..... 327566
```

```
product length = 172
Forward primer 1 GCAACATAGAGTCGCAGTGG 20
Template 324936 .....A..... 324917
Reverse primer 1 TAGCTAGCACCCGTGTACAC 20
Template 324765 ..... 324784
```

>[XM\\_010705915.1](#) Leishmania panamensis cathepsin L-like protease (CPB), partial mRNA

```
product length = 172
Forward primer 1 GCAACATAGAGTCGCAGTGG 20
Template 470 ..... 489

Reverse primer 1 TAGCTAGCACCCGTGTACAC 20
Template 641 ..... 622
```

>[GQ180933.1](#) Leishmania guyanensis cysteine protease (CPB) gene, complete cds

```
product length = 172
Forward primer 1 GCAACATAGAGTCGCAGTGG 20
Template 470 ..... 489

Reverse primer 1 TAGCTAGCACCCGTGTACAC 20
Template 641 ..... 622
```

>[EU289030.1](#) Leishmania panamensis cysteine protease gene, complete cds

```
product length = 172
Forward primer 1 GCAACATAGAGTCGCAGTGG 20
Template 470 ..... 489

Reverse primer 1 TAGCTAGCACCCGTGTACAC 20
Template 641 ..... 622
```

>[AJ512653.1](#) Leishmania guyanensis partial cpb gene for cysteine proteinase b

```
product length = 172
Forward primer 1 GCAACATAGAGTCGCAGTGG 20
Template 44 ..... 63

Reverse primer 1 TAGCTAGCACCCGTGTACAC 20
Template 215 ..... 196
```

>[LN609206.1](#) Leishmania peruviana genome assembly Leishmania peruviana LEM-1537\_V1, chromosome : 8

```
product length = 172
Forward primer 1 GCAACATAGAGTCGCAGTGG 20
Template 345480 ..... 345461

Reverse primer 1 TAGCTAGCACCCGTGTACAC 20
Template 345309 .....T..... 345328
```

>[XM\\_001562091.1](#) Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 cathepsin L-like protease (CPB), partial mRNA

```
product length = 172
Forward primer 1 GCAACATAGAGTCGCAGTGG 20
Template 470 ..... 489

Reverse primer 1 TAGCTAGCACCCGTGTACAC 20
Template 641 .....A..... 622
```

>[XM\\_001562090.1](#) Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 cathepsin L-like protease (CPB), partial mRNA

```
product length = 172
Forward primer 1 GCAACATAGAGTCGCAGTGG 20
Template 470 ..... 489

Reverse primer 1 TAGCTAGCACCCGTGTACAC 20
Template 641 .....A..... 622
```

>[XM\\_001562089.1](#) Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 cathepsin L-like protease (CPB), partial mRNA

```
product length = 172
Forward primer 1 GCAACATAGAGTCGCAGTGG 20
Template 470 .....A..... 489

Reverse primer 1 TAGCTAGCACCCGTGTACAC 20
Template 641 ..... 622
```

## Anexo 3

### Análisis de especificidad de cebadores diseñados para discriminación de subgénero *Leishmania* en el paquete bioinformático Primer-BLAST (Sin nucleótidos degenerados)

#### Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	CGTCATGACCATCTCGCCA	19	59.86	57.89
Reverse primer	TCAGCAATGATCTCCAGCGT	20	59.46	50.00

#### Products on target templates

>[CP027836.1](#) *Leishmania infantum* strain TR01 isolate Lin\_TR01 chromosome 36, complete sequence

```
product length = 300
Forward primer 1 CGTCATGACCATCTCGCCA 19
Template 8555 ..... 8537

Reverse primer 1 TCAGCAATGATCTCCAGCGT 20
Template 8256 ..... 8275
```

>[CP022651.1](#) *Leishmania donovani* strain pasteur chromosome 36, complete sequence

```
product length = 300
Forward primer 1 CGTCATGACCATCTCGCCA 19
Template 16247 ..... 16229

Reverse primer 1 TCAGCAATGATCTCCAGCGT 20
Template 15948 ..... 15967
```

>[CP019545.1](#) *Leishmania donovani* strain MHOM/IN/1983/AG83 isolate late passage chromosome 36 sequence

```
product length = 300
Forward primer 1 CGTCATGACCATCTCGCCA 19
Template 7134 ..... 7116

Reverse primer 1 TCAGCAATGATCTCCAGCGT 20
Template 6835 ..... 6854
```

>[CP018604.1](#) *Leishmania donovani* strain MHOM/IN/1983/AG83 isolate early passage chromosome 36 sequence

```
product length = 300
Forward primer 1 CGTCATGACCATCTCGCCA 19
Template 7139 ..... 7121

Reverse primer 1 TCAGCAATGATCTCCAGCGT 20
Template 6840 ..... 6859
```

>[XM\\_003865074.1](#) *Leishmania donovani* N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase-like protein (LDBPK\_360040), partial mRNA

```
product length = 300
Forward primer 1 CGTCATGACCATCTCGCCA 19
Template 537 ..... 555

Reverse primer 1 TCAGCAATGATCTCCAGCGT 20
Template 836 ..... 817
```

>[FR799623.2](#) *Leishmania donovani* BPK282A1 complete genome, chromosome 36

```
product length = 300
Forward primer 1 CGTCATGACCATCTCGCCA 19
Template 11188 ..... 11170

Reverse primer 1 TCAGCAATGATCTCCAGCGT 20
Template 10889 ..... 10908
```

## Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	CGTCATGACCATCTCGCCA	19	59.86	57.89
Reverse primer	TCAGCAATGATCTCCAGCGT	20	59.46	50.00

### Products on target templates

>[FR796468.1](#) Leishmania infantum JPCM5 genome chromosome 36

```
product length = 300
Forward primer 1  CGTCATGACCATCTCGCCA 19
Template      8543 ..... 8525
```

```
Reverse primer 1  TCAGCAATGATCTCCAGCGT 20
Template      8244 ..... 8263
```

>[XM\\_001686521.1](#) Leishmania major strain Friedlin N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase-like protein partial mRNA

```
product length = 300
Forward primer 1  CGTCATGACCATCTCGCCA 19
Template      537 ..... 555
```

```
Reverse primer 1  TCAGCAATGATCTCCAGCGT 20
Template      836 ..... 817
```

>[XM\\_001469566.1](#) Leishmania infantum JPCM5 N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase-like protein partial mRNA

```
product length = 300
Forward primer 1  CGTCATGACCATCTCGCCA 19
Template      537 ..... 555
```

```
Reverse primer 1  TCAGCAATGATCTCCAGCGT 20
Template      836 ..... 817
```

>[XM\\_003874297.1](#) Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103 N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase-like protein partial mRNA

```
product length = 300
Forward primer 1  CGTCATGACCATCTCGCCA 19
Template      537 .....C 555
```

```
Reverse primer 1  TCAGCAATGATCTCCAGCGT 20
Template      836 ..... 817
```

>[FR799573.1](#) Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103 complete genome, chromosome 20

```
product length = 300
Forward primer 1  CGTCATGACCATCTCGCCA 19
Template      14008 .....C 13990
```

```
Reverse primer 1  TCAGCAATGATCTCCAGCGT 20
Template      13709 ..... 13728
```

>[FR796432.1](#) Leishmania major strain Friedlin complete genome, chromosome 36

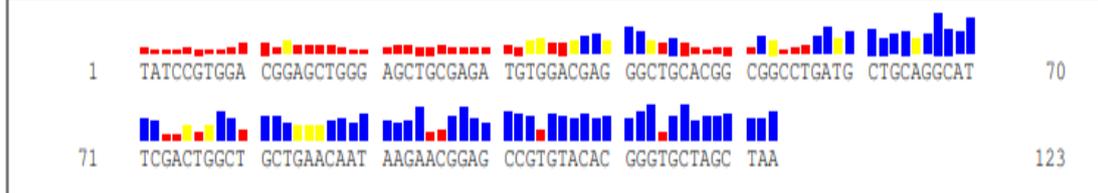
```
product length = 300
Forward primer 1  CGTCATGACCATCTCGCCA 19
Template      14781 ..... 14763
```

```
Reverse primer 1  TCAGCAATGATCTCCAGCGT 20
Template      14482 ..... 14501
```

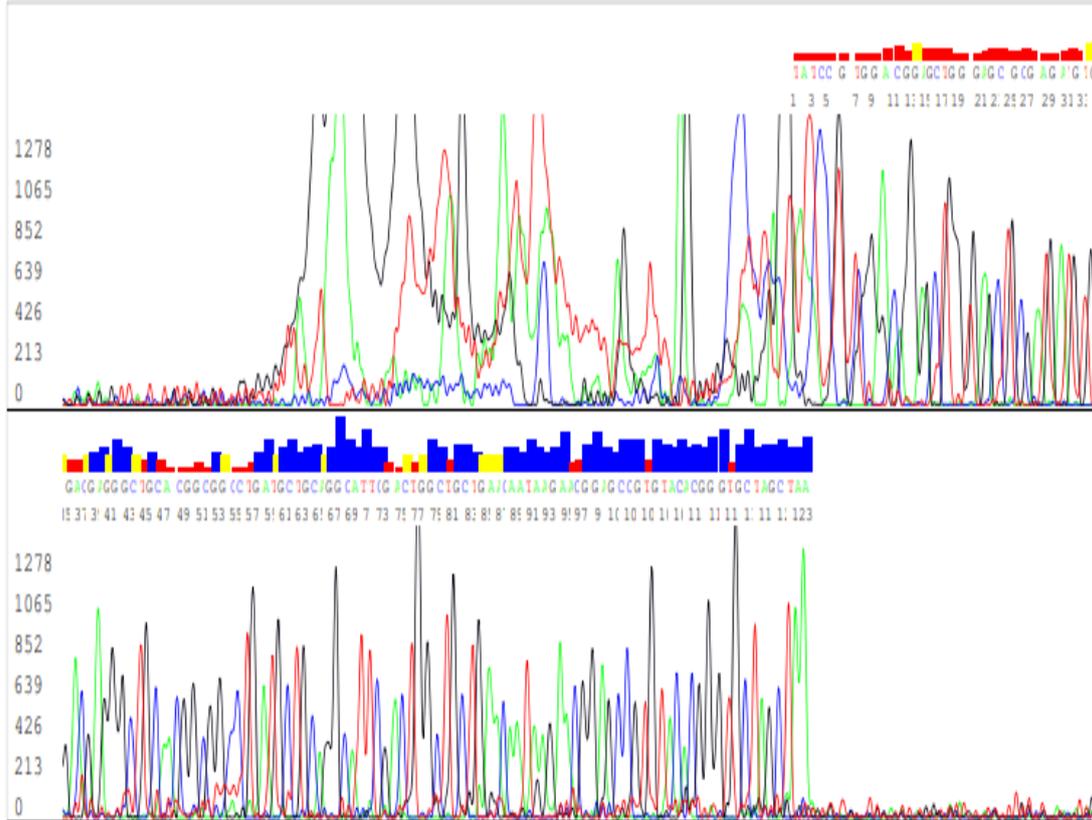
## Anexo 4

### 4.1 Resultados de secuenciación del amplicón de 172bp a partir del cebador ICPB-F470 y ICPB-R641.


SEC\_B06\_1F-B\_2018-05-28  
1F-B  
Inst Model/Name 3100/UDLA3130-20352-012  
May 28,2018 09:27PM, GMT-05:00  
KB\_3130\_POP7\_BDTV3.mob  
Pts 2050 to 8460 Pk1 Loc:2050  
May 28,2018 09:40PM, GMT-05:00  
Spacing:12.64  
Plate Name: 2018-05-28-SERVSEC  
 S/N G:15 A:11 T:11 C:13  
 KB.bcp  
 KB 1.4.0 Cap:2  
 Version 5.3.1 HISQV Bases: 63

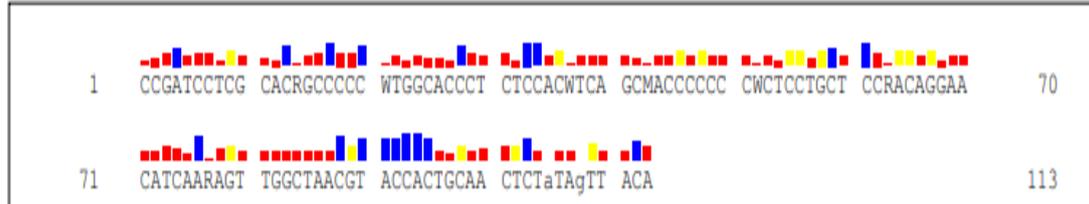



SEC\_B06\_1F-B\_2018-05-28  
1F-B  
Inst Model/Name 3100/UDLA3130-20352-012  
May 28,2018 09:27PM, GMT-05:00  
KB\_3130\_POP7\_BDTV3.mob  
Pts 2050 to 8460 Pk1 Loc:2050  
May 28,2018 09:40PM, GMT-05:00  
Spacing:12.64 Pts/Panel1500  
Plate Name: 2018-05-28-SERVSEC  
 S/N G:15 A:11 T:11 C:13  
 KB.bcp  
 KB 1.4.0 Cap:2  
 Version 5.3.1 HISQV Bases: 63

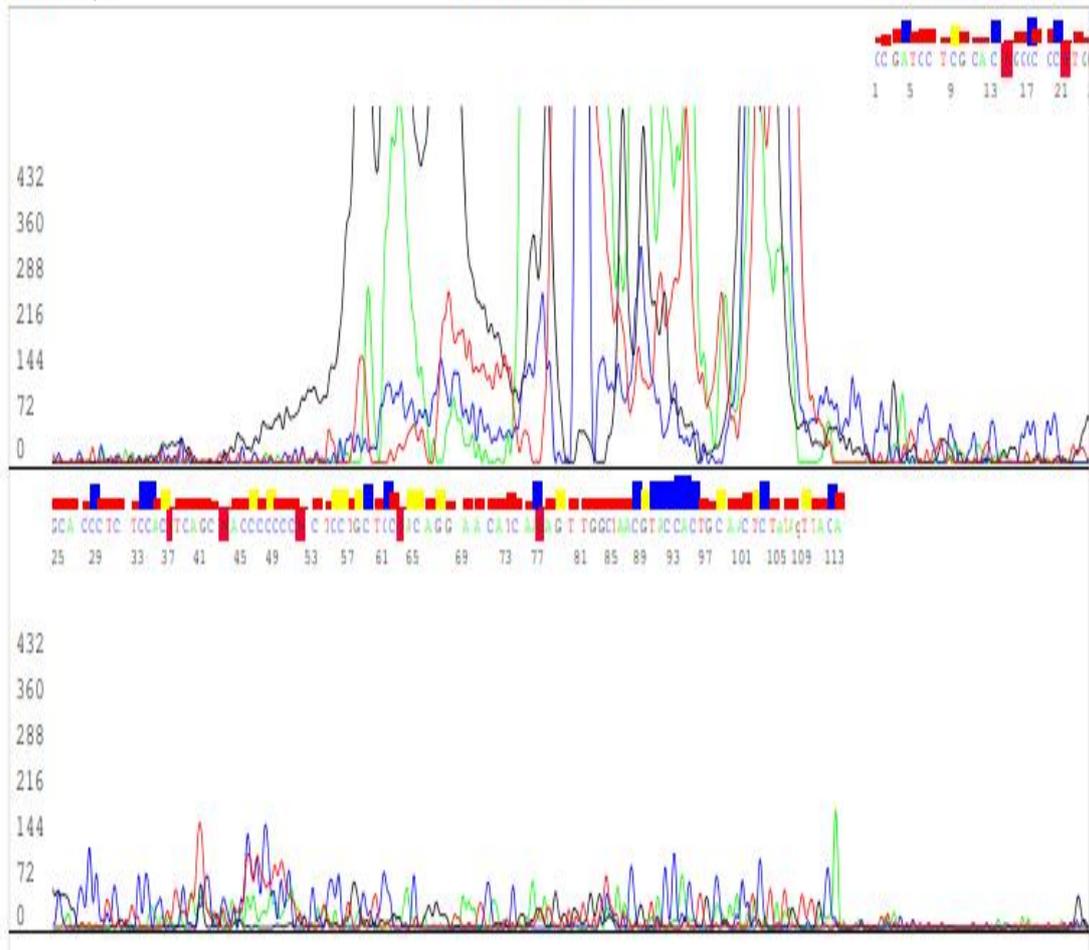


## 4.2 Resultados de secuenciación del amplicón de 172bp a partir del cebador ICPB-R641


SEC\_C12\_2R-B\_2018-05-30  
2R-B  
Inst Model/Name 3100/UDLA3130-20352-012  
May 30,2018 12:46PM, GMT-05:00  
KB\_3130\_POP7\_BDTv3.mob  
Pts 2050 to 5960 Pk1 Loc:2050  
May 30,2018 01:00PM, GMT-05:00  
Spacing:12.64  
Plate Name: 2018-05-30-SERVSEC  
 S/N G:37 A:19 T:17 C:14  
 KB.bcp  
 KB 1.4.0 Cap:3  
 Version 5.3.1 HISQV Bases: 26




SEC\_C12\_2R-B\_2018-05-30  
2R-B  
Inst Model/Name 3100/UDLA3130-20352-012  
May 30,2018 12:46PM, GMT-05:00  
KB\_3130\_POP7\_BDTv3.mob  
Pts 2050 to 5960 Pk1 Loc:2050  
May 30,2018 01:00PM, GMT-05:00  
Spacing:12.64 Pts/Panel1500  
Plate Name: 2018-05-30-SERVSEC  
 S/N G:37 A:19 T:17 C:14  
 KB.bcp  
 KB 1.4.0 Cap:3  
 Version 5.3.1 HISQV Bases: 26



# Anexo 5

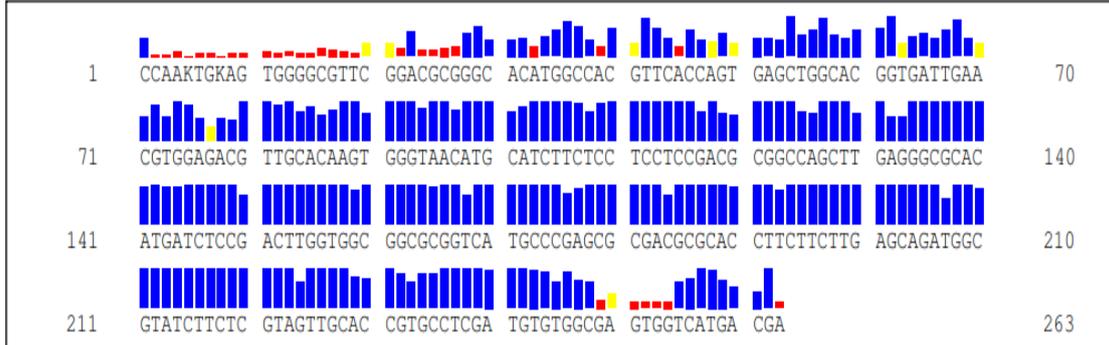
## Resultados de secuenciación del amplicón de 300bp a partir del cebador INAGA-F537



S/N G:309 A:185 T:357 C:492  
 KB.bcp  
 KB 1.4.0 Cap:3

SEC\_G03\_Lesh-FW-Lesh\_2018-10-03  
 Lesh-FW-Lesh  
 KB\_3130\_POP7\_BDTv3.mob  
 Pts 3213 to 12460 Pk1 Loc:3188  
 Version 5.3.1 HISQV Bases: 222

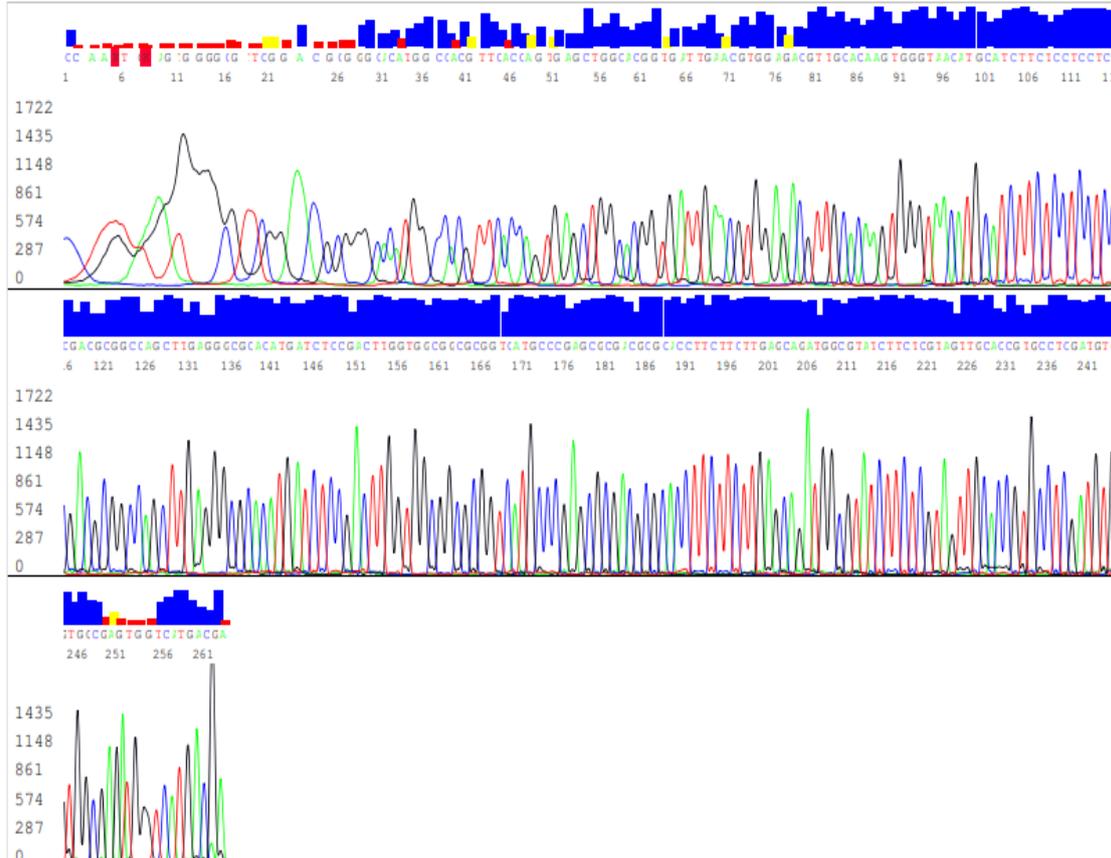
Inst Model/Name 3100/GA3130-20352-012  
 Oct 03,2018 10:26PM, GMT-05:00  
 Oct 03,2018 10:40PM, GMT-05:00  
 Spacing:14.23  
 Plate Name: 2018-10-03-SERVSEC-1



S/N G:309 A:185 T:357 C:492  
 KB.bcp  
 KB 1.4.0 Cap:3

SEC\_G03\_Lesh-FW-Lesh\_2018-10-03  
 Lesh-FW-Lesh  
 KB\_3130\_POP7\_BDTv3.mob  
 Pts 3213 to 12460 Pk1 Loc:3188  
 Version 5.3.1 HISQV Bases: 222

Inst Model/Name 3100/GA3130-20352-012  
 Oct 03,2018 10:26PM, GMT-05:00  
 Oct 03,2018 10:40PM, GMT-05:00  
 Spacing:14.23 Pts/Panel1500  
 Plate Name: 2018-10-03-SERVSEC-1



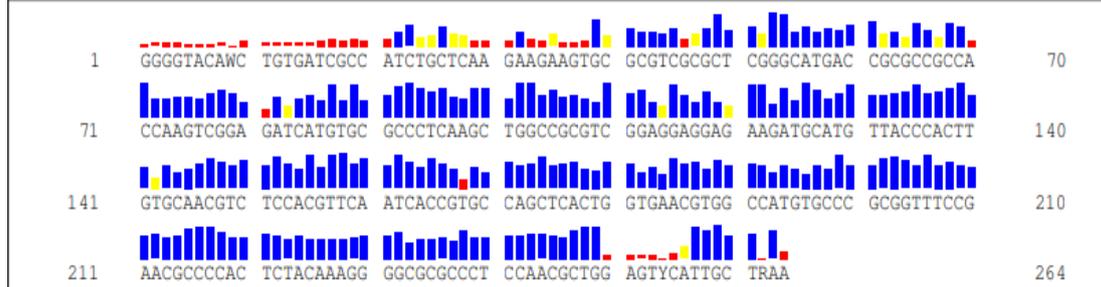
# Resultados de secuenciación del amplicón de 300bp a partir del cebador INAGA-R836



S/N G:246 A:189 T:252 C:410  
KB.bcp  
KB 1.4.0 Cap:4

SEC\_H03\_Lesh-RV-Lesh\_2018-10-03  
Lesh-RV-Lesh  
KB\_3130\_POP7\_BDTv3.mob  
Pts 3180 to 12460 Pk1 Loc:3155  
Version 5.3.1 HiSQV Bases: 210

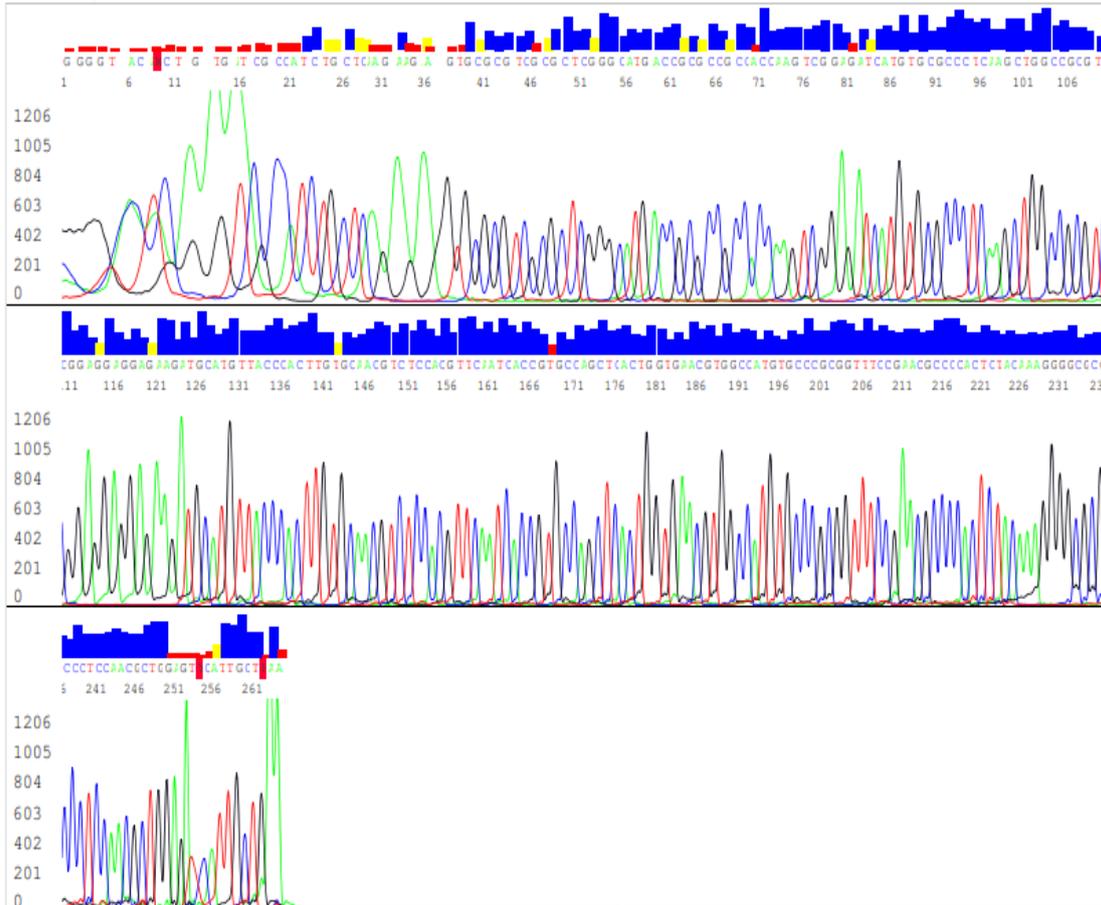
Inst Model/Name 3100/GA3130-20352-012  
Oct 03,2018 10:26PM, GMT-05:00  
Oct 03,2018 10:40PM, GMT-05:00  
Spacing:14.22  
Plate Name: 2018-10-03-SERVSEC-1



S/N G:246 A:189 T:252 C:410  
KB.bcp  
KB 1.4.0 Cap:4

SEC\_H03\_Lesh-RV-Lesh\_2018-10-03  
Lesh-RV-Lesh  
KB\_3130\_POP7\_BDTv3.mob  
Pts 3180 to 12460 Pk1 Loc:3155  
Version 5.3.1 HiSQV Bases: 210

Inst Model/Name 3100/GA3130-20352-012  
Oct 03,2018 10:26PM, GMT-05:00  
Oct 03,2018 10:40PM, GMT-05:00  
Spacing:14.22 Pts/Panel1500  
Plate Name: 2018-10-03-SERVSEC-1



## Anexo 6

### Verificación bioinformática de resultados de secuenciación del fragmento amplificado discriminante para el subgénero *Viannia* mediante el uso del algoritmo del paquete bioinformático NCBI-BLAST

#### Secuencia 1F-B (Secuenciación Forward)



5'-TATCCGTGGA CGGAGCTGGG AGCTGCGAGA TGTGGACGAG  
 GGCTGCACGG CGGCCTGATG CTGCAGGCAT TCGACTGGCT  
 GCTGAACAAT AAGAACGGAG CCGTGTACAC GGGTGCTAGC TAA-3'

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leishmania panamensis cathepsin L-like protease (CPB), partial mRNA</a>	191	191	90%	4e-45	97%	<a href="#">XM_010705915.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leishmania panamensis strain MHOM/PA/94/PSC-1 chromosome 8 sequence</a>	191	191	90%	4e-45	97%	<a href="#">CP009377.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leishmania guyanensis cysteine protease (CPB) gene, complete cds</a>	191	191	90%	4e-45	97%	<a href="#">GQ180933.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leishmania panamensis cysteine protease gene, complete cds</a>	191	191	90%	4e-45	97%	<a href="#">EU289030.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leishmania guyanensis partial cpb gene for cysteine proteinase b</a>	187	187	90%	5e-44	96%	<a href="#">AJ512653.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leishmania peruviana genome assembly Leishmania peruviana PAB-4377_V1, chromosome : 8</a>	174	174	90%	4e-40	95%	<a href="#">LN609243.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 complete genome, chromosome 8</a>	174	174	90%	4e-40	95%	<a href="#">FR798982.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 cathepsin L-like protease (CPB), partial mRNA</a>	174	174	90%	4e-40	95%	<a href="#">XM_001562089.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Cloning vector pQ-CPB recombinant cysteine protease mRNA, partial cds</a>	163	163	90%	9e-37	93%	<a href="#">AY850168.1</a>

#### Leishmania panamensis cathepsin L-like protease (CPB), partial mRNA

Sequence ID: [XM\\_010705915.1](#) Length: 1329 Number of Matches: 1

Range 1: 528 to 641 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
191 bits(103)	4e-45	111/114(97%)	3/114(2%)	Plus/Plus
Query 12	GGAGCTGG - GAGCTGCGA - GATGTGGACGAGGGCTGC - ACGGC GGCC TGATGCTGCAGGC	68		
Sbjct 528	GGAGCTGGTGAGCTGCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGC GGCC TGATGCTGCAGGC	587		
Query 69	ATTTCGACTGGCTGCTGAACAATAAGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTA	122		
Sbjct 588	ATTTCGACTGGCTGCTGAACAATAAGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTA	641		

#### Leishmania panamensis strain MHOM/PA/94/PSC-1 chromosome 8 sequence

Sequence ID: [CP009377.1](#) Length: 436873 Number of Matches: 1

Range 1: 359367 to 359480 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
191 bits(103)	4e-45	111/114(97%)	3/114(2%)	Plus/Minus
Query 12	GGAGCTGG - GAGCTGCGA - GATGTGGACGAGGGCTGCA - ACGGC GGCC TGATGCTGCAGGC	68		
Sbjct 359480	GGAGCTGGTGAGCTGCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGC GGCC TGATGCTGCAGGC	359421		
Query 69	ATTTCGACTGGCTGCTGAACAATAAGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTA	122		
Sbjct 359420	ATTTCGACTGGCTGCTGAACAATAAGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTA	359367		

Leishmania guyanensis cysteine protease (CPB) gene, complete cds  
 Sequence ID: [GQ180933.1](#) Length: 1326 Number of Matches: 1

Range 1: 528 to 641 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
191 bits(103)	4e-45	111/114(97%)	3/114(2%)	Plus/Plus
Query 12	GGAGCTGG-GAGCTGCGA-GATGTGGACGAGGGCTGC-ACGGCGGCCTGATGCTGCAGGC			68
Sbjct 528	GGAGCTGGTGAGCTGCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGCCTGATGCTGCAGGC			587
Query 69	ATTCGACTGGCTGCTGAACAATAAGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTA			122
Sbjct 588	ATTCGACTGGCTGCTGAACAATAAGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTA			641

Leishmania panamensis cysteine protease gene, complete cds  
 Sequence ID: [EU289030.1](#) Length: 1326 Number of Matches: 1

Range 1: 528 to 641 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
191 bits(103)	4e-45	111/114(97%)	3/114(2%)	Plus/Plus
Query 12	GGAGCTGG-GAGCTGCGA-GATGTGGACGAGGGCTGC-ACGGCGGCCTGATGCTGCAGGC			68
Sbjct 528	GGAGCTGGTGAGCTGCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGCCTGATGCTGCAGGC			587
Query 69	ATTCGACTGGCTGCTGAACAATAAGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTA			122
Sbjct 588	ATTCGACTGGCTGCTGAACAATAAGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTA			641

Leishmania guyanensis partial cpb gene for cysteine proteinase b  
 Sequence ID: [AJ512653.1](#) Length: 522 Number of Matches: 1

Range 1: 102 to 215 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
187 bits(101)	5e-44	110/114(96%)	3/114(2%)	Plus/Plus
Query 12	GGAGCTGG-GAGCTGCGA-GATGTGGACGAGGGCTGC-ACGGCGGCCTGATGCTGCAGGC			68
Sbjct 102	GGAGCTGGTGAGCTGCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGCCTGATGCTGCAGGC			161
Query 69	ATTCGACTGGCTGCTGAACAATAAGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTA			122
Sbjct 162	ATTCGACTGGCTGCTGRACAATAAGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTA			215

Leishmania peruviana genome assembly Leishmania peruviana PAB-4377\_V1, chromosome : 8  
 Sequence ID: [LN609243.1](#) Length: 395183 Number of Matches: 1

Range 1: 331914 to 332027 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
174 bits(94)	4e-40	108/114(95%)	3/114(2%)	Plus/Minus
Query 12	GGAGCTGG-GAGCTGCGA-GATGTGGACGAGGGCTGCA-CGGCGGCCTGATGCTGCAGGC			68
Sbjct 332027	GGAGCTGGTGAGCTGCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGCCTGATGCTGCAGGC			331968
Query 69	ATTCGACTGGCTGCTGAACAATAAGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTA			122
Sbjct 331967	GTTTGACTGGCTGCTGAACAATAGGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTA			331914

Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 complete genome, chromosome 8  
 Sequence ID: [FR798982.1](#) Length: 386780 Number of Matches: 1

Range 1: 324765 to 324878 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
174 bits(94)	4e-40	108/114(95%)	3/114(2%)	Plus/Minus
Query 12	GGAGCTGG-GAGCTGCGA-GATGTGGACGAGGGCTGCA-CGGCGGCCTGATGCTGCAGGC			68
Sbjct 324878	GGAGCTGGTGAGCTGCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGCCTGATGCTGCAGGC			324819
Query 69	ATTCGACTGGCTGCTGAACAATAAGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTA			122
Sbjct 324818	GTTTGACTGGCTGCTGAACAATAGGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTA			324765

Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 cathepsin L-like protease (CPB), partial mRNA  
 Sequence ID: [XM\\_001562089.1](#) Length: 1326 Number of Matches: 1

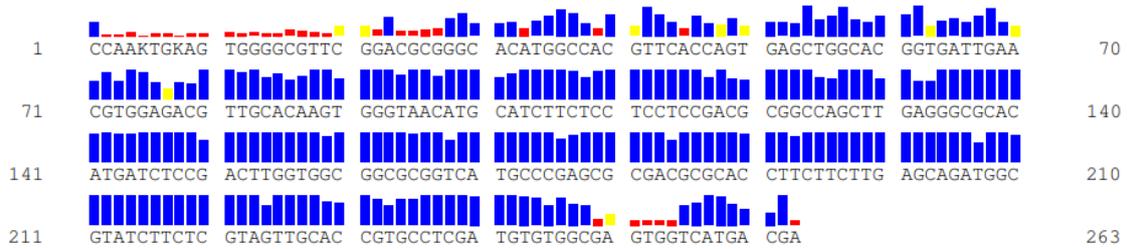
Range 1: 528 to 641 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
174 bits(94)	4e-40	108/114(95%)	3/114(2%)	Plus/Plus
Query 12	GGAGCTGG-GAGCTGCGA-GATGTGGACGAGGGCTGC-ACGGCGGCCTGATGCTGCAGGC			68
Sbjct 528	GGAGCTGGTGAGCTGCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGCCTGATGCTGCAGGC			587
Query 69	ATTCGACTGGCTGCTGAACAATAAGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTA			122
Sbjct 588	GTTTGACTGGCTGCTGAACAATAGGAACGGAGCCGTGTACACGGGTGCTAGCTA			641

## Anexo 7

### Verificación bioinformática de resultados de secuenciación del fragmento amplificado discriminante para el subgénero *Leishmania* mediante el uso del algoritmo del paquete bioinformático NCBI-BLAST

#### Secuencia LeshF (Secuenciación Forward)



5'-CCAAATTGAG TGGGGCGTTC GGACGCGGGC ACATGGCCAC  
 GTTCACCAGT GAGCTGGCAC GGTGATTGAA CGTGGAGACG  
 TTGCACAAGT GGGTAACATG CATCTTCTCC TCCTCCGACG  
 CGGCCAGCTT GAGGGCGCAC ATGATCTCCG ACTTGGTGGC  
 GCGCGGTCA TGCCCGAGCG CGACGCGCAC CTTCTTCTTG  
 AGCAGATGGC GTATCTTCTC GTAGTTGCAC CGTGCCTCGA  
 TGTGTGGCGA GTGGTCATGA CGA-3'

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103 N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase-like protein partial mRNA</a>	425	425	97%	3e-115	97%	<a href="#">XM_003874297.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103 complete genome, chromosome 20</a>	425	425	97%	3e-115	97%	<a href="#">FR799573.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leishmania donovani strain MHOMIN/1983/AG83 isolate late passage chromosome 36 sequence</a>	359	359	97%	3e-95	92%	<a href="#">CP019545.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leishmania donovani strain MHOMIN/1983/AG83 isolate early passage chromosome 36 sequence</a>	359	359	97%	3e-95	92%	<a href="#">CP018604.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leishmania donovani N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase-like protein (LDBPK_360040), partial mRNA</a>	359	359	97%	3e-95	92%	<a href="#">XM_003865074.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 36</a>	359	359	97%	3e-95	92%	<a href="#">FR799623.2</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leishmania infantum strain TR01 isolate Lin. TR01 chromosome 36, complete sequence</a>	353	353	97%	1e-93	92%	<a href="#">CP027836.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leishmania donovani strain pasteur chromosome 36, complete sequence</a>	353	353	97%	1e-93	92%	<a href="#">CP022651.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leishmania infantum JPCM5 genome, chromosome 36</a>	353	353	97%	1e-93	92%	<a href="#">FR796468.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leishmania infantum JPCM5 N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase-like protein partial mRNA</a>	353	353	97%	1e-93	92%	<a href="#">XM_001469566.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leishmania major strain Friedlin complete genome, chromosome 36</a>	348	348	97%	7e-92	91%	<a href="#">FR796432.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leishmania major strain Friedlin N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase-like protein partial mRNA</a>	348	348	97%	7e-92	91%	<a href="#">XM_001686521.1</a>

Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103 N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase-like protein partial mRNA  
 Sequence ID: [XM\\_003874297.1](#) Length: 1299 Number of Matches: 1

Range 1: 537 to 795 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
425 bits(230)	3e-115	250/259(97%)	4/259(1%)	Plus/Minus
Query 7	GAGTGGGGCGTTTCGGA---	CGCGGGCACATGGCCACGTT	CACCAAGT	GAGCTGGCACGGTG 63
Sbjct 795	GAGTGGGGCGTTTCGGAAAC	CGCGGGCACATGGCCCGTT	CACCAAGT	GAGCTGGCACGGTG 736
Query 64	ATTGAACGTGGAGACGTTG	CACAAGTGGGTAACATGCAT	TTCTCCTCCTCCGACGCGGC	123
Sbjct 735	ATTGAAGGTGGAGACGTTG	CACAAGTGGGTAACATGCAT	TTCTCCTCCTCCGACGCGGC	676
Query 124	CAGCTTGAGGGCGCACATG	ATCTCCGACTTGGTGGCGGCGGGT	CATGCCCGAGCGCGAC	183
Sbjct 675	CAGCTTGAGAGCGCACATG	ATCTCCGACTTGGTGGCGGCGGGT	CATGCCCGAGCGCGAC	616
Query 184	GCGCACCTTCTTCTTGAG	CAGATGGCGTATCTTCTCGT	AGTTGCACCGTGCCTCGATGTG	243
Sbjct 615	GCGCACCTTCTTCTTGAG	CAGATGGCGTATCTTCTCGT	AGTTGCACCGTGCCTCGATGTG	556
Query 244	TGGCGAG-TGGTCATGACG			261
Sbjct 555	GGGCGAGATGGTCATGACG			537

Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103 complete genome, chromosome 20  
 Sequence ID: [FR799573.1](#) Length: 3343498 Number of Matches: 1

Range 1: 13750 to 14008 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
425 bits(230)	3e-115	250/259(97%)	4/259(1%)	Plus/Plus
Query 7	GAGTGGGGCGTTTCGGA---	CGCGGGCACATGGCCACGTT	CACCAAGT	GAGCTGGCACGGTG 63
Sbjct 13750	GAGTGGGGCGTTTCGGAAAC	CGCGGGCACATGGCCCGTT	CACCAAGT	GAGCTGGCACGGTG 13809
Query 64	ATTGAACGTGGAGACGTTG	CACAAGTGGGTAACATGCAT	TTCTCCTCCTCCGACGCGGC	123
Sbjct 13810	ATTGAAGGTGGAGACGTTG	CACAAGTGGGTAACATGCAT	TTCTCCTCCTCCGACGCGGC	13869
Query 124	CAGCTTGAGGGCGCACATG	ATCTCCGACTTGGTGGCGGCGGGT	CATGCCCGAGCGCGAC	183
Sbjct 13870	CAGCTTGAGAGCGCACATG	ATCTCCGACTTGGTGGCGGCGGGT	CATGCCCGAGCGCGAC	13929
Query 184	GCGCACCTTCTTCTTGAG	CAGATGGCGTATCTTCTCGT	AGTTGCACCGTGCCTCGATGTG	243
Sbjct 13930	GCGCACCTTCTTCTTGAG	CAGATGGCGTATCTTCTCGT	AGTTGCACCGTGCCTCGATGTG	13989
Query 244	TGGCGAG-TGGTCATGACG			261
Sbjct 13990	GGGCGAGATGGTCATGACG			14008

Leishmania donovani strain MHOM/IN/1983/AG83 isolate late passage chromosome 36 sequence  
 Sequence ID: [CP019545.1](#) Length: 2714535 Number of Matches: 1

Range 1: 6876 to 7134 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
359 bits(194)	3e-95	238/259(92%)	4/259(1%)	Plus/Plus
Query 7	GAGTGGGGCGTTTCGG--	A-CGCGGGCACATGGCCACGTT	CACCAAGT	GAGCTGGCACGGTG 63
Sbjct 6876	GAGCGGGCGGTTTCGGGAAC	CGCGGGCACATGGCCCGTT	CACCAAGT	GAGCTGGCACGGTG 6935
Query 64	ATTGAACGTGGAGACGTTG	CACAAGTGGGTAACATGCAT	TTCTCCTCCTCCGACGCGGC	123
Sbjct 6936	ATTGAACGTGGAGACGTTG	CACAAGTGGGTAACATGCAT	TTCTCCTCCTCCGAGGTTGC	6995
Query 124	CAGCTTGAGGGCGCACATG	ATCTCCGACTTGGTGGCGGCGGGT	CATGCCCGAGCGCGAC	183
Sbjct 6996	CAGCTTGAGGGCGCCATAA	TCTCCGACTTGGAGGCGGCGGGT	CGTGCCCGAGGGCAAC	7055
Query 184	GCGCACCTTCTTCTTGAG	CAGATGGCGTATCTTCTCGT	AGTTGCACCGTGCCTCGATGTG	243
Sbjct 7056	GCGCACCTTCTTCTCGAG	GAGTGGCGTATCTTCTCGT	AGTTACACCGTGCCTCGATGTG	7115
Query 244	TGGCGAG-TGGTCATGACG			261
Sbjct 7116	TGGCGAGATGGTCATGACG			7134

Leishmania donovani strain MHOM/IN/1983/AG83 isolate early passage chromosome 36 sequence

Sequence ID: [CP018604.1](#) Length: 2743999 Number of Matches: 1

Range 1: 6881 to 7139 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
359 bits(194)	3e-95	238/259(92%)	4/259(1%)	Plus/Plus
Query 7	GAGTGGGGCGTTTCGG--A-CGCGGGCACATGGCCACGTTACCAAGTGAGCTGGCACGGTG	63		
Sbjct 6881	GAGCGGCAGCGTTTCGGGAACCGCGGGCACATGGCCGTTACCAAGTGAGCTGGCACGGTG	6940		
Query 64	ATTGAACGTGGAGACGTTGCACAAGTGGGTAACATGCATCTTCTCCTCCTCCGACGCGGC	123		
Sbjct 6941	ATTGAACGTGGAGACGTTGCACAAGTGGGTAACATGCATCTTCTCCTCCTCCGAGGTTGC	7000		
Query 124	CAGCTTGAGGGCGCACATGATCTCCGACTTGGTGGCGGCGCGGTCATGCCCGAGCGCGAC	183		
Sbjct 7001	CAGCTTGAGGGCGCCATAATCTCCGACTTGGAGGCGGCGGTCATGCCCGAGGGCAAC	7060		
Query 184	GCGCACCTTCTTCTGAGCAGATGGCGTATCTTCTCGTAGTTGCACCGTGCCTCGATGTG	243		
Sbjct 7061	GCGCACCTTCTTCTCGAGGAGTGGCGTATCTTCTCGTAGTTACACCGTGCCTCGATGTG	7120		
Query 244	TGGCGAG-TGGTCATGACG	261		
Sbjct 7121	TGGCGAGATGGTCATGACG	7139		

Leishmania donovani N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase-like protein (LDBPK\_360040), partial mRNA

Sequence ID: [XM\\_003865074.1](#) Length: 1299 Number of Matches: 1

Range 1: 537 to 795 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
358 bits(194)	3e-95	238/259(92%)	4/259(1%)	Plus/Minus
Query 7	GAGTGGGGCGTTTCGG--A-CGCGGGCACATGGCCACGTTACCAAGTGAGCTGGCACGGTG	63		
Sbjct 795	GAGCGGCAGCGTTTCGGGAACCGCGGGCACATGGCCGTTACCAAGTGAGCTGGCACGGTG	736		
Query 64	ATTGAACGTGGAGACGTTGCACAAGTGGGTAACATGCATCTTCTCCTCCTCCGACGCGGC	123		
Sbjct 735	ATTGAACGTGGAGACGTTGCACAAGTGGGTAACATGCATCTTCTCCTCCTCCGAGGTTGC	676		
Query 124	CAGCTTGAGGGCGCACATGATCTCCGACTTGGTGGCGGCGCGGTCATGCCCGAGCGCGAC	183		
Sbjct 675	CAGCTTGAGGGCGCCATAATCTCCGACTTGGAGGCGGCGGTCATGCCCGAGGGCAAC	616		
Query 184	GCGCACCTTCTTCTGAGCAGATGGCGTATCTTCTCGTAGTTGCACCGTGCCTCGATGTG	243		
Sbjct 615	GCGCACCTTCTTCTCGAGGAGTGGCGTATCTTCTCGTAGTTACACCGTGCCTCGATGTG	556		
Query 244	TGGCGAG-TGGTCATGACG	261		
Sbjct 555	TGGCGAGATGGTCATGACG	537		

Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 36

Sequence ID: [FR799623.2](#) Length: 2713248 Number of Matches: 1

Range 1: 10930 to 11188 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
359 bits(194)	3e-95	238/259(92%)	4/259(1%)	Plus/Plus
Query 7	GAGTGGGGCGTTTCGG--A-CGCGGGCACATGGCCACGTTACCAAGTGAGCTGGCACGGTG	63		
Sbjct 10930	GAGCGGCAGCGTTTCGGGAACCGCGGGCACATGGCCGTTACCAAGTGAGCTGGCACGGTG	10989		
Query 64	ATTGAACGTGGAGACGTTGCACAAGTGGGTAACATGCATCTTCTCCTCCTCCGACGCGGC	123		
Sbjct 10990	ATTGAACGTGGAGACGTTGCACAAGTGGGTAACATGCATCTTCTCCTCCTCCGAGGTTGC	11049		
Query 124	CAGCTTGAGGGCGCACATGATCTCCGACTTGGTGGCGGCGCGGTCATGCCCGAGCGCGAC	183		
Sbjct 11050	CAGCTTGAGGGCGCCATAATCTCCGACTTGGAGGCGGCGGTCATGCCCGAGGGCAAC	11109		
Query 184	GCGCACCTTCTTCTGAGCAGATGGCGTATCTTCTCGTAGTTGCACCGTGCCTCGATGTG	243		
Sbjct 11110	GCGCACCTTCTTCTCGAGGAGTGGCGTATCTTCTCGTAGTTACACCGTGCCTCGATGTG	11169		
Query 244	TGGCGAG-TGGTCATGACG	261		
Sbjct 11170	TGGCGAGATGGTCATGACG	11188		

Leishmania infantum strain TR01 isolate Lin\_TR01 chromosome 36, complete sequence

Sequence ID: [CP027836.1](#) Length: 2680433 Number of Matches: 1

Range 1: 8297 to 8555 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
353 bits(191)	1e-93	237/259(92%)	4/259(1%)	Plus/Plus
Query 7	GAGTGGGGCGTTCGG--A-CGCGGGCACATGGCCACGTTACCAAGTGAGCTGGCACGGTG	63		
Sbjct 8297	GAGCGGCGCGTTCGGGAACCGCGGACACATGGCCGTGTTACCAAGTGAGCTGGCACGGTG	8356		
Query 64	ATTGAACGTGGAGACGTTGCACAAGTGGGTAACATGCATCTTCTCCTCCTCCGACGCGGC	123		
Sbjct 8357	ATTGAACGTGGAGACGTTGCACAAGTGGGTAACATGCATCTTCTCCTCCTCCGAGGTTGC	8416		
Query 124	CAGCTTGAGGGCGCACATGATCTCCGACTTGGTGGCGGCGCGGTATGCCCGAGCGCGAC	183		
Sbjct 8417	CAGCTTGAGGGCGCCATAATCTCCGACTTGGAGGCGGCGCGGTCTGTGCCGAGGGCAAC	8476		
Query 184	GCGCACCTTCTTCTTGAGCAGATGGCGTATCTTCTCGTAGTTGCACCGTGCCTCGATGTG	243		
Sbjct 8477	GCGCACCTTCTTCTCGAGGAGGTGGCGTATCTTCTCGTAGTTACACCGTGCCTCGATGTG	8536		
Query 244	TGGCGAG-TGGTCATGACG	261		
Sbjct 8537	TGGCGAGATGGTCATGACG	8555		

Leishmania donovani strain pasteur chromosome 36, complete sequence

Sequence ID: [CP022651.1](#) Length: 2775122 Number of Matches: 1

Range 1: 15989 to 16247 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
353 bits(191)	1e-93	237/259(92%)	4/259(1%)	Plus/Plus
Query 7	GAGTGGGGCGTTCGG--A-CGCGGGCACATGGCCACGTTACCAAGTGAGCTGGCACGGTG	63		
Sbjct 15989	GAGCGGCGCGTTCGGGAACCGCGGGCACATGGCCGTGTTACCAAGTGAGCTGGCACGGTG	16048		
Query 64	ATTGAACGTGGAGACGTTGCACAAGTGGGTAACATGCATCTTCTCCTCCTCCGACGCGGC	123		
Sbjct 16049	ATTGAACGTGGAGACGTTGCACAAGTGGGTAACATGCATCTTCTCCTCCTCCGAGGTTGC	16108		
Query 124	CAGCTTGAGGGCGCACATGATCTCCGACTTGGTGGCGGCGCGGTATGCCCGAGCGCGAC	183		
Sbjct 16109	CAGCTTGAGGGCGCCATAATCTCCGACTTGGAGGCGGCGCGGTCTGTGCCGAGGGCAAC	16168		
Query 184	GCGCACCTTCTTCTTGAGCAGATGGCGTATCTTCTCGTAGTTGCACCGTGCCTCGATGTG	243		
Sbjct 16169	GCGCACCTTCTTCTCGAGGAGGTGGCGTATCTTCTCGTAGTTACACCGTGCCTCGATGTG	16228		
Query 244	TGGCGAG-TGGTCATGACG	261		
Sbjct 16229	TGGCGAGATGGTCATGACG	16247		

Leishmania infantum JPCM5 genome chromosome 36

Sequence ID: [FR796468.1](#) Length: 2673956 Number of Matches: 1

Range 1: 8285 to 8543 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
353 bits(191)	1e-93	237/259(92%)	4/259(1%)	Plus/Plus
Query 7	GAGTGGGGCGTTCGG--A-CGCGGGCACATGGCCACGTTACCAAGTGAGCTGGCACGGTG	63		
Sbjct 8285	GAGCGGCGCGTTCGGGAACCGCGGACACATGGCCGTGTTACCAAGTGAGCTGGCACGGTG	8344		
Query 64	ATTGAACGTGGAGACGTTGCACAAGTGGGTAACATGCATCTTCTCCTCCTCCGACGCGGC	123		
Sbjct 8345	ATTGAACGTGGAGACGTTGCACAAGTGGGTAACATGCATCTTCTCCTCCTCCGAGGTTGC	8404		
Query 124	CAGCTTGAGGGCGCACATGATCTCCGACTTGGTGGCGGCGCGGTATGCCCGAGCGCGAC	183		
Sbjct 8405	CAGCTTGAGGGCGCCATAATCTCCGACTTGGAGGCGGCGCGGTCTGTGCCGAGGGCAAC	8464		
Query 184	GCGCACCTTCTTCTTGAGCAGATGGCGTATCTTCTCGTAGTTGCACCGTGCCTCGATGTG	243		
Sbjct 8465	GCGCACCTTCTTCTCGAGGAGGTGGCGTATCTTCTCGTAGTTACACCGTGCCTCGATGTG	8524		
Query 244	TGGCGAG-TGGTCATGACG	261		
Sbjct 8525	TGGCGAGATGGTCATGACG	8543		

Leishmania infantum JPCM5 N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase-like protein partial mRNA

Sequence ID: [XM\\_001469566.1](#) Length: 1299 Number of Matches: 1

Range 1: 537 to 795 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
353 bits(191)	1e-93	237/259(92%)	4/259(1%)	Plus/Minus
Query 7	GAGTGGGGCGTTTCGG--A-CGCGGGCACATGGCCACGTTACCAAGTGAGCTGGCACGGTG			63
Sbjct 795	GAGCGGCAGCGTTTCGGGAACCGCGGACACATGGCCGTTACCAAGTGAGCTGGCACGGTG			736
Query 64	ATTGAACGTGGAGACGTTGCACAAGTGGGTAACATGCATCTTCTCCTCCGACGCGGC			123
Sbjct 735	ATTGAACGTGGAGACGTTGCACAAGTGGGTAACATGCATCTTCTCCTCCGAGGTTGC			676
Query 124	CAGCTTGAGGGCGCACATGATCTCCGACTTGGTGGCGGCGCGGTCATGCCCGAGCGCGAC			183
Sbjct 675	CAGCTTGAGGGCGCCATAATCTCCGACTTGGAGGCGGCGGTCGTGCCGAGGGCAAC			616
Query 184	GCGCACCTTCTTCTTGAGCAGATGGCGTATCTTCTCGTAGTTGCACCGTGCCTCGATGTG			243
Sbjct 615	GCGCACCTTCTTCTGAGGAGGTGGCGTATCTTCTCGTAGTTACACCGTGCCTCGATGTG			556
Query 244	TGGCGAG-TGGTCATGACG	261		
Sbjct 555	TGGCGAGATGGTCATGACG	537		

Leishmania major strain Friedlin complete genome, chromosome 36

Sequence ID: [FR796432.1](#) Length: 2682151 Number of Matches: 1

Range 1: 14523 to 14781 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
348 bits(188)	7e-92	236/259(91%)	4/259(1%)	Plus/Plus
Query 7	GAGTGGGGCGTTTCGGA---CGCGGGCACATGGCCACGTTACCAAGTGAGCTGGCACGGTG			63
Sbjct 14523	GAGCGGCAGCGTTTCGGAACCGCGGGCACATGGCCGCGTTACCAAGTGAGCTGGCACGGTG			14582
Query 64	ATTGAACGTGGAGACGTTGCACAAGTGGGTAACATGCATCTTCTCCTCCGACGCGGC			123
Sbjct 14583	ATTGAAGGTGGAGACGTTACACAAGTGGGTGACATGCATCTTCTCCTCCGACGCTGC			14642
Query 124	CAGCTTGAGGGCGCACATGATCTCCGACTTGGTGGCGGCGCGGTCATGCCCGAGCGCGAC			183
Sbjct 14643	CAGCTTGAGGGCGCCATGATCTCCGACTTGGAGGCGGCGCGGTCGTGCCGAGCGCAAC			14702
Query 184	GCGCACCTTCTTCTTGAGCAGATGGCGTATCTTCTCGTAGTTGCACCGTGCCTCGATGTG			243
Sbjct 14703	GCGCACCTTCTTCTCCAGCAGGTACCTTACCTTCTCGTAGTTGCACCGTGCATCGATGTG			14762
Query 244	TGGCGAG-TGGTCATGACG	261		
Sbjct 14763	TGGCGAGATGGTCATGACG	14781		

Leishmania major strain Friedlin N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase-like protein partial mRNA

Sequence ID: [XM\\_001686521.1](#) Length: 1299 Number of Matches: 1

Range 1: 537 to 795 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
348 bits(188)	7e-92	236/259(91%)	4/259(1%)	Plus/Minus
Query 7	GAGTGGGGCGTTTCGGA---CGCGGGCACATGGCCACGTTACCAAGTGAGCTGGCACGGTG			63
Sbjct 795	GAGCGGCAGCGTTTCGGAACCGCGGGCACATGGCCGCGTTACCAAGTGAGCTGGCACGGTG			736
Query 64	ATTGAACGTGGAGACGTTGCACAAGTGGGTAACATGCATCTTCTCCTCCGACGCGGC			123
Sbjct 735	ATTGAAGGTGGAGACGTTACACAAGTGGGTGACATGCATCTTCTCCTCCGACGCTGC			676
Query 124	CAGCTTGAGGGCGCACATGATCTCCGACTTGGTGGCGGCGCGGTCATGCCCGAGCGCGAC			183
Sbjct 675	CAGCTTGAGGGCGCCATGATCTCCGACTTGGAGGCGGCGGTCGTGCCGAGCGCAAC			616
Query 184	GCGCACCTTCTTCTTGAGCAGATGGCGTATCTTCTCGTAGTTGCACCGTGCCTCGATGTG			243
Sbjct 615	GCGCACCTTCTTCTCCAGCAGGTACCTTACCTTCTCGTAGTTGCACCGTGCATCGATGTG			556
Query 244	TGGCGAG-TGGTCATGACG	261		
Sbjct 555	TGGCGAGATGGTCATGACG	537		

## Anexo 8

### Cartas de aprobación de los comités de bioética de la Universidad Internacional del Ecuador (UIDE) y del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI).



**COMUNICACIÓN**  
**UIDE-FCM-EDM-COM-18-0009**  
**Comité de Ética**  
**Escuela de Medicina**

**PARA:** Dr. Jacob Bezemer  
**Investigador Principal**

**DE:** Dr. David Bastidas H.  
**Presidente del Comité de Ética para la Investigación en Seres Humanos (CEISH)-UIDE**

**ASUNTO:** Protocolo Aprobado – Cód. Ref.: CEU-069-18

**FECHA:** 23 de abril de 2018

De mi consideración:

El Comité de Bioética para Investigación en Seres Humanos ha evaluado su proyecto titulado: "Diagnóstico por la Técnica de Amplificación Isotérmica Mediada por Asas (LAMP), Identificación de Especies en Muestras Obtenidas en Papel Filtro, Estudio de Calidad De Vida y Determinación de Ubicación Geográfica de Pacientes con Leishmaniasis Mucocutánea en las Provincias de Napo, Pastaza, Morona Santiago y Pichincha (2018 – 2021). ", al no existir observaciones ni comentarios se decide su aprobación definitiva, por lo tanto, puede proseguir con la ejecución de la investigación.

Atentamente,

  
Dr. David Bastidas  
Presidente Comité de Ética



**Universidad Internacional del Ecuador**  
**Facultad de Ciencias Médicas, de la Salud y de la Vida**  
Edificio Administrativo, 2do. piso Avda. Jorge Fernández y Simón Bolívar Quito, Ecuador  
Teléfono: + 593 2 2985600 ext 2263 Correo electrónico: ceish@uide.edu.ec Skype: ceish-uide

[www.uide.edu.ec](http://www.uide.edu.ec)

**Notificación de la revisión del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública –Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI-LIP)**

**Para:** Dr. Carlos Vinicio Chiluisa Guacho.

**Título del Protocolo:** “Evidencia microscópica y molecular de infección humana por filarias *Mansonella* spp. en la región amazónica, Ecuador”.

**Protocolo #:** CEISH-INSPI-013

**Versión:** 2

**Fecha de recepción del protocolo:** 14 de abril del 2018

**Fecha de resolución:** 24 de mayo 2018

**Resolución:** Este tipo de protocolo no se corresponde con un Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos.

Por medio de la presente se certifica que el estudio de investigación, “EVIDENCIA MICROSCÓPICA Y MOLECULAR DE INFECCIÓN HUMANA POR FILARIAS MANSONELLA SPP. EN LA REGIÓN AMAZÓNICA, ECUADOR”, fue revisado por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI Dr. Leopoldo Izquieta Pérez.

Para dar el aval al proyecto “Evidencia microscópica y molecular de infección humana por filarias *Mansonella* spp. en la región amazónica, Ecuador”. Se requiere de lo siguiente:

- En virtud que el proyecto está basado en láminas que fueron tomadas de seres humanos, se solicita adjuntar el procedimiento de anonimización de los datos y láminas.

En caso de requerir otra información adicional diríjelas al CEISH del INSPI-LIP, a la dirección: Calle Iquique N14-285 y Yaguachi, Sector el Dorado. Puede encontrar información adicional en el sitio web del CEISH, <http://www.investigacionsalud.gob.ec/web/ceish/>, o de manera directa a su Secretaria, Verónica Toaquiza, al email [ntoaquiza@inspi.gob.ec](mailto:ntoaquiza@inspi.gob.ec).

Cordialmente,



Ana Lucía Ruano Phd.

Presidenta del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública-Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI-LIP)

29 de mayo del 2018

*Fecha de Correspondencia*

